

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE,
GEOLOGICHE E AMBIENTALI

DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA ED ECOLOGIA VEGETALE
IN AMBIENTE MEDITERRANEO

XXIV CICLO

TESI DI DOTTORATO

di

Giuseppe Pavarese

**Dinamiche di speciazione e dispersione
delle Orchidee mediterranee
in condizioni di insularità**

TUTOR:
PROF.SSA
ANTONIA CRISTAUDO

COORDINATORE:
PROF.
GIUSEPPE MAUGERI

ANNO 2011

Sommario

Capitolo 1. Introduzione 1

1.1	La distribuzione delle specie e i meccanismi di dispersione	2
1.1.1	<i>Attuale composizione vegetazionale del bacino del Mediterraneo</i>	2
1.1.2	<i>Storia geologica del Mediterraneo</i>	7
1.1.3	<i>Storia paleoclimatica del Mediterraneo</i>	10
1.1.4	<i>Eventi biogeografici: Vicarianza</i>	15
1.1.5	<i>Eventi filogeografici: Dispersione e movimento delle specie</i>	18
1.2	La cladogenesi e i meccanismi di speciazione	27
1.2.1	<i>Speciazione allopatrica</i>	27
1.2.2	<i>Speciazione simpatica</i>	30
1.2.3	<i>La poliploidia</i>	35
1.2.3.1	<i>Origine dei poliploidi</i>	36
1.2.3.2	<i>Vari fattori che promuovono la poliploidia</i>	38
1.2.3.3	<i>Classificazione dei poliploidi</i>	40
1.2.3.4	<i>Conseguenze ed implicazioni della poliploidia</i>	43
	<i>La poliploidia e l'evoluzione di nuove specie</i>	43
	<i>Altre conseguenze della poliploidia</i>	49
1.3	Caratteristiche della famiglia delle Orchidee	52
1.3.1	<i>Caratteri morfologici</i>	53
1.3.2	<i>Apparato radicale</i>	53
1.3.3	<i>Le foglie e lo stelo</i>	54
1.3.4	<i>Il fiore</i>	55

1.3.5	<i>Fecondazione e formazione dei semi</i>	57
1.3.6	<i>La biologia riproduttiva delle orchidee</i>	58
1.3.7	<i>Biologia dell'impollinazione delle Orchidee</i>	61
1.4	Scopo della tesi	63
1.5	Bibliografia	65

Capitolo 2. Filogeografia di una popolazione sarda isolata di *Platanthera bifolia* var. *kuenkelei* 80

2.1	Introduzione	81
2.2	Risultati	85
2.3	Discussione	90
2.4	Bibliografia	96

Capitolo 3. Genesi e caratterizzazione dell'endemismo siciliano *Neotinea commutata* (Tod.) R. M. Bateman 102

3.1	Introduzione	103
3.2	Risultati	108
3.2.1	<i>Distribuzione dei taxa</i>	108
3.2.2	<i>Analisi morfometriche</i>	111
3.2.3	<i>Analisi del DNA plastidiale</i>	114
3.2.4	<i>Analisi del DNA nucleare</i>	115
3.2.5	<i>Analisi del cariotipo</i>	116

3.2.6	<i>Analisi del contenuto nucleare di DNA</i>	118
3.2.7	<i>Analisi dell'efficienza di impollinazioni</i>	122
3.3	Discussione	124
3.4	Conclusioni	129
3.5	Bibliografia	132

***Appendice: Materiali e metodi* 136**

Estrazione del DNA	137
Elettroforesi su gel d'agarosio	137
Amplificazione delle sequenze ribosomali e plastidiali	138
Purificazione dei prodotti amplificati	140
Reazioni di sequenza	141
Analisi morfologiche	142
Esperimenti di impollinazione manuale e vitalità dei semi	143
Analisi citologiche	144
Citometria a flusso (FCM)	143
Bibliografia	144

Capitolo 1.

Introduzione

1.1 La distribuzione delle specie e i meccanismi di dispersione

1.1.1 Attuale composizione vegetazionale del bacino del Mediterraneo

L'ambiente mediterraneo caratterizza cinque diverse specifiche aree geografiche del pianeta, comprese all'incirca tra i 30° e i 45° di latitudine dell'emisfero settentrionale e dell'emisfero meridionale. La principale di queste insiste nel bacino del mar Mediterraneo, mentre le altre aree sono distribuite rispettivamente in California, Cile centrale, Sud Africa e Australia sud-occidentale (Cowling *et al.*, 1996; Blondel & Aronson, 1999; Thompson, 2005). Il clima è attualmente caratterizzato da estati calde e aride ed inverni temperati o miti con l'assenza di escursioni termiche tipiche di quelli continentali. L'alternanza di aridità estiva e consistenti precipitazioni dall'autunno alla primavera rende la disponibilità d'acqua nelle fasi torride il principale fattore selettivo per gli adattamenti delle specie vegetali mediterranee (Specht, 1969; Barboni *et al.*, 2004; Thompson, 2005). Dal livello del mare ai rilievi montuosi, il peso della siccità estiva si riduce, producendo fasce altitudinali costituite da differenti comunità vegetali (Pignatti, 1979; Quézel & Médail, 2003). Specificamente nel bacino del Mediterraneo, l'antica e profonda influenza delle popolazioni umane sul territorio, storicamente effettuata con l'impiego del fuoco, ha determinato una eterogeneità vegetazionale caratteristica in particolare lungo le coste. Questi caratteri, insieme alla storia geologica e climatica complessa ed alle eterogenee condizioni orografiche attuali, fanno sì che il bioma mediterraneo ospiti circa il 20% della flora vascolare globale su un'area complessiva pari a meno 2% della superficie terrestre (Médail & Quézel, 1997).

Oggi nelle aree costiere mediterranee il paesaggio è prevalentemente caratterizzato da formazioni vegetazionali dette *macchia*: un tipo di vegetazione arbustiva sempreverde molto densa e in alcuni tratti impenetrabile, costituita dalle

stesse piante che un tempo formavano le foreste a sclerofille (Axelrod, 1975; Palamarev, 1998) a cui si aggiunge una consistente rappresentanza di specie xerofile come *Myrtus communis*, *Euphorbia dendroides*, *Cystus sp.* e *Chamaerops humilis*. Nelle regioni in cui la selezione operata dall'aridità estiva è particolarmente accentuata si costituisce una forma vegetazionale più degradata della macchia, rappresentata dalla *gariga*. In questo caso, la vegetazione, più xerica, è caratterizzata da piante di piccole dimensioni, non superando il mezzo metro di altezza, e colorazione grigiasta, polverosa per la villosità, la glaucescenza e la viscosità, tipiche delle foglie dei suffrutici delle piante a pulvinare (Pignatti, 1995). In casi di aridità estrema invece, il suolo si impoverisce al punto di determinare la completa scomparsa delle piante legnose, in favore di cenosi pseudo-steppe dominate da radi cespi perennanti, tra cui si insediano neofite e terofite (Thompson, 2005). Un ampio range di forme intermedie tra questi scenari xerici caratterizza le aree costiere del bacino del Mediterraneo a causa dell'eterogeneità geologica, dei microclimi locali e dell'uso del territorio da parte dell'uomo (Tomaselli, 1981; Pons *et al.*, 1995; Blondel & Aronson, 1999).

A quote più elevate, la selezione operata dalla siccità estiva si fa meno stringente, e consente l'evoluzione della comunità vegetale verso condizioni di maturità, a carattere forestale (Quézel & Médail, 2003). Un *climax* litoraneo e caldo è rappresentato infatti dal cosiddetto *Oleo – Ceratonion*, un complesso di associazioni altamente dinamiche adattate a condizioni di termoxericità, la cui vegetazione è rappresentata dalla *macchia-foresta* (Béguinot, 1922), e in cui specie guida sono *Olea europea var. oleaster*, *Ceratonia siliqua*, spesso associate a *Myrtus communis* e *Pistacia lentiscus* (Blondel & Aronson, 1999). In fasce altitudinali maggiori ritroviamo invece il *climax* tipico della regione mediterranea costituito dal *Quercion ilicis*, la foresta di quercia sempreverde a sclerofille dominata appunto dal leccio (*Quercus ilex*), e associata a roverella (*Quercus pubescens*) e acero minore (*Acer monspessulanum*; Pignatti, 1998; Blondel & Aronson, 1999). Uno strato arboreo inferiore, limitato

nella crescita dalla debole luce che arriva sul suolo, ospita vaste popolazioni di *Arbutus unedo* e *Phyllirea media*, a contatto con uno strato arbustivo superiore molto ricco e denso, caratterizzato da sclerofille come *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Rhamnus alaternus* e *Viburnum timus*, su cui si sviluppano piante lianose (*Smilax sp.*; Pignatti, 1998). Per adattamento all'aridità estiva, tali arbusti presentano tutti foglie coriacee, spesso ricoperte di peli, con superfici fogliari ridotte per limitare e controllare la traspirazione, che assumono forma da ellittica a lineare, fino in taluni casi a ridursi in squamette (Pignatti, 1995).

Attualmente le foreste sempreverdi di querce sono divenute una rarità, e le formazioni arbustive sono molto più estese di quelle forestali, per le condizioni climatiche e edafiche, nonché per la ricorsività degli incendi naturali e per le attività antropiche passate e presenti, che contribuiscono a mantenere le cenosi in una condizione di costante *subclimax*, impedendone l'evoluzione verso una struttura forestale (Quézel & Médail, 2003). A quote più elevate, l'estate si fa meno arida e lunga, garantendo un certo approvvigionamento idrico anche nel periodo estivo. Il fattore limitante per la vegetazione non è più rappresentato da indici ecologici di xerothermicità, ma dalle gelate invernali, altrettanto determinanti per la disponibilità d'acqua (Thompson, 2005). La foresta a sclerofille è quindi sostituita dalla foresta a latifoglie decidua, formazione forestale con biomassa maggiore e copertura più rada rispetto al bosco a sclerofille. La foresta a latifoglie è infatti caratterizzata da un sottobosco luminoso con un ricco strato arbustivo ed erbaceo, privo di lianose in cui l'essenza arborea dominante è la roverella (*Quercus pubescens*). Essa si accompagna ad altre specie termofile, quali il carpino nero, l'orniello e il bosso mentre, in condizioni più fresche, alla roverella subentrano il cerro, il tiglio e il ciliegio selvatico. Dagli 800 m slm, compaiono le faggete mediterranee, formazioni boschive ad adattamento più temperato, che presentano le medesime caratteristiche fisionomico-strutturali delle tipiche faggete centro-europee, ma se ne differenziano per la composizione, essendo

ricche di essenze tipiche mediterranee di flora mesofita. Sull'Appennino e sulle isole, la faggeta rappresenta la fascia più alta di vegetazione forestale, al di sopra della quale (2000 m in Sicilia), a causa delle condizioni ambientali avverse, non possono crescere le Fanerofite, ma bensì una vegetazione arbustiva costituita da frutici spinosi addensati in cuscinetti emisferici più o meno alti come gli astragali e le ginestre. Variazioni nella composizione edafica e nella disponibilità di risorse generano aree in cui la cenosi non può raggiungere lo stadio *climax*, rimanendo composta da specie erbacee e rade essenze arbustive.

La composizione dell'ecosistema mediterraneo è profondamente alterata dalle attività umane che risalgono in taluni casi al Neolitico e che continuano ancora oggi. La diffusione della pastorizia, delle *transumanze* e l'uso intensivo di aree disboscate o incendiate come pascolo per gli armenti hanno determinato, durante secoli di attività, la formazione di zone più o meno estese prive di copertura arborea, che mostrano un'elevata biodiversità di specie erbacee. Oggi che tali attività sono state soppiantate da processi industriali, queste aree sono nuovamente disponibili alla ricolonizzazione da parte di specie arboree a comporre il *climax* mediterraneo tipico. Ciononostante, praterie più o meno umide, a distribuzione frammentaria, persistono in tutti i territori mediterranei da quote di medie altitudini fino ai pascoli d'alta quota, nella forma di prati ancora oggi in parte pascolati. Questi ecosistemi ospitano prevalentemente graminacee, fabacee, asteracee, associate in comunità di terofite più o meno variabili che soprattutto nei periodi delle fioriture primaverili, mostrano l'elevata ricchezza in specie (Blondel & Aronson, 1999), tipica delle fasi ecologiche di *subclimax*. L'aridità estiva in questo contesto, avendo effetti più o meno marcati a seconda dell'altitudine e di condizioni ecologiche locali, fornisce un altro elemento di variabilità ambientale che si riflette nella composizione vegetale di questi territori.

In aree localizzate, prodotte dalla varietà orografica dei territori mediterranei, questo scenario eterogeneo dà luogo a condizioni estremamente peculiari dal punto di

vista microclimatico. Valli, forre, e coperture vegetali a composizione tipicamente stenoterma, in associazione a disponibilità idrica sufficiente, riproducono occasionalmente su scala ridotta gli ambienti temperati delle foreste umide del centro Europa, offrendo nicchie ecologiche adatte a popolazioni isolate di specie non tipicamente mediterranee. Questi microhabitat producono condizioni adatte a piante erbacee che vivono in associazione con le tipiche essenze boschive centroeuropee. Si ritrovano così popolazioni isolate derivanti proprio da antenati centroeuropei che utilizzarono le aree mediterranee come rifugi glaciali (Bennett *et al.*, 1991; Willis & Whittaker, 2000), e che da lì si sono poi espansi in epoca postglaciale, permanendo talvolta in condizioni microclimatiche adatte ed estremamente localizzate (Comes & Kadereit, 1998; Brewer *et al.*, 2002). Un esempio è rappresentato dalla presenza sulle isole maggiori mediterranee di boschi umidi temperati di limitata estensione immersi in areali più tipicamente xerici.

In complesso la composizione vegetale del bacino del Mediterraneo è una commistione di specie, composta da elementi tropicali più antichi di origine meridionale e numerose essenze ad adattamento più temperato tipiche del centro Europa, che seguono *pattern* distributivi molto frammentati (Comes & Kadereit, 1998; Thompson, 2005). Una condizione che si traduce in un gran numero di *endemismi* ed ecotipi in *distribuzione disgiunta* rispetto a specie tipiche di aree continentali europee ed africane, aspetti peculiari delle aree mediterranee (Thompson, 2005).

1.1.2 Storia geologica del Mediterraneo

L'attuale distribuzione delle specie vegetali presenti nel bacino del Mediterraneo, nonché l'elevato numero di endemismi, è frutto principalmente di importanti dinamiche climatiche e geologiche. Lo sviluppo e l'affermazione delle cenosi del Mediterraneo non possono essere descritti senza tener conto dei cambiamenti climatici dell'ultimo Miocene e del Pliocene. Ma non si può ignorare la più antica storia di cambiamenti geologici, che attraverso fratture e spostamenti di placche continentali ha prodotto le basi per la distribuzione attuale delle specie vegetali. Di questi fenomeni, i più antichi sono ovviamente distribuiti lungo l'era Cenozoica da circa 68 milioni di anni fa, quando si manifestano i primi effetti dello scontro della placca tettonica africana contro quella eurasiatica e dei conseguenti movimenti delle microplacche correlate (Meulenkamp & Sissingh, 2003; Jolivet *et al.*, 2006). Tale movimento tettonico portò progressivamente a produrre e a comprimere quella depressione che nelle epoche successive sarebbe divenuta il bacino del Mediterraneo. Quest'area geografica comprendeva era distinta infatti due diversi distretti. Ad oriente i bacini Ionio, Erodoto e Levante rappresentavano i residui dell'Oceano Neotetide del Mesozoico superiore (Garfunkel, 2004). Sul versante occidentale invece, i bacini Tirreno, Ligure, Provenzale, Algerino e Alborano si erano formati a partire dall'Oligocene (tra i 30 e i 34 Ma) come conseguenza diretta della convergenza tra placca Africana ed Eurasiatica che produsse un movimento di arretramento delle zone di subduzione (Biju-Duval *et al.*, 1977; Gueguen *et al.*, 1998; Rosenbaum *et al.*, 2002a). In particolare, per gli scopi di questo lavoro, l'area occidentale del bacino merita attenzione per via delle enormi variazioni di posizione subite dalle grandi isole del Mediterraneo, Corsica, Sardegna e Sicilia. L'attuale diversificazione degli endemismi che le caratterizzano e le loro relazioni con specie affini presenti sulle placche continentali sono strettamente legate alla storia della microplacca Cirno-Sarda

(Rosenbaum *et al.*, 2002a). La figura 1.1 descrive i momenti salienti delle transizioni geologiche. Durante l'Oligocene Inferiore (35-30 Ma), un massiccio montuoso Ercinico connetteva i Pirenei agli altri massicci silicei dei Maures e dell'Esterel fino alle Alpi, per mezzo delle aree geologiche che oggi corrispondono alle scogliere nord-orientali di Minorca, Corsica e Sardegna. Queste ultime infatti erano parte integrante dell'ambiente geografico ed ecologico continentale con un orientamento di 30° e 60° più a nordovest (Hsü, 1971; Westphal *et al.*, 1976; Cohen, 1980; Cherchi & Montadert, 1982).

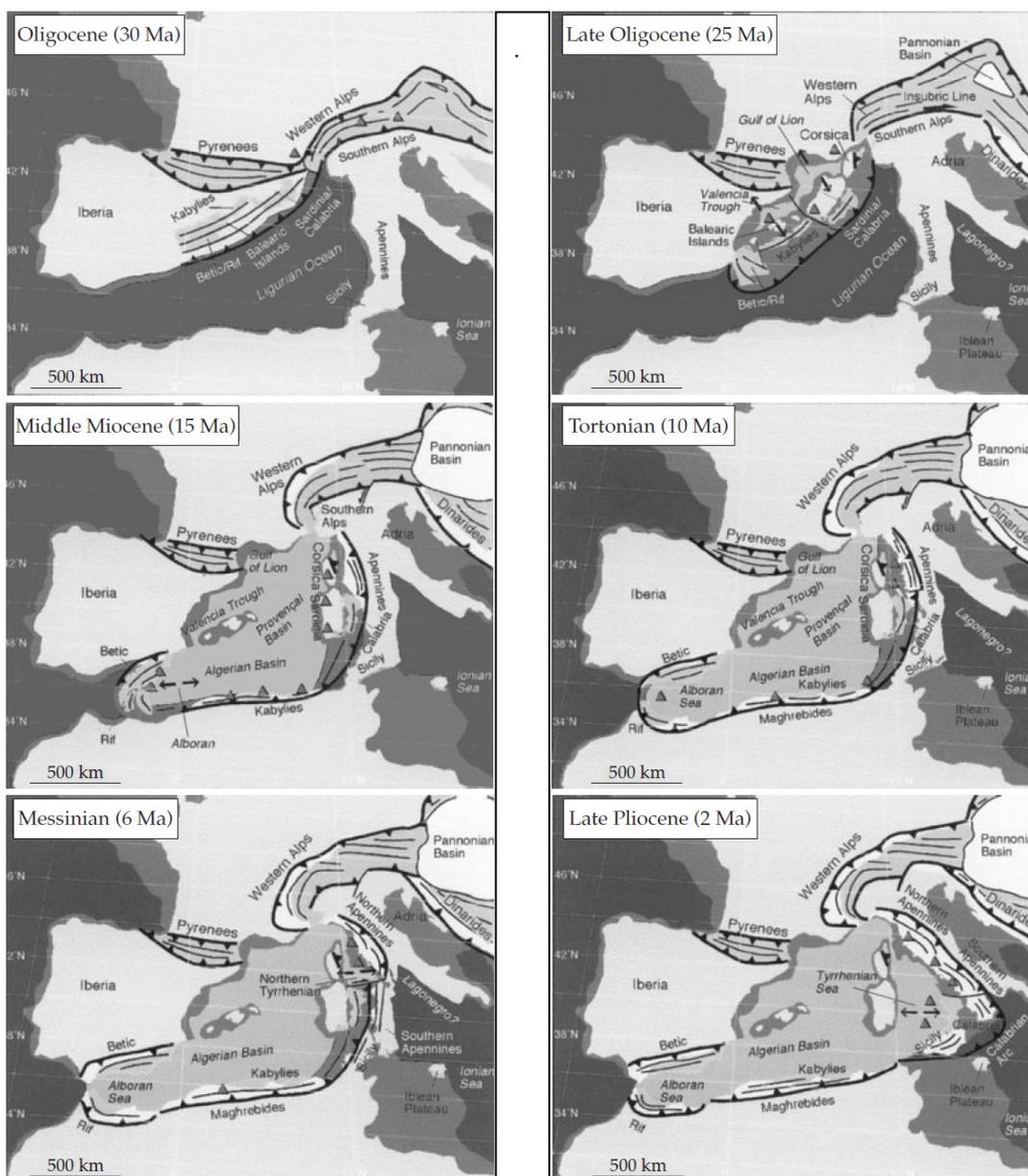


Figura 1.1. Movimenti delle microplacche tettoniche nella genesi del bacino del Mediterraneo occidentale negli ultimi 30 milioni di anni (come in Thompson, 2005).

La Corsica era connessa a oriente al massiccio dell'Esterel (oggi sud est francese; Alvarez, 1976; Cohen, 1980), e ad occidente con le attuali Sardegna, Calabria, la Kabylie (oggi Nord Africa), e la Cordigliera Betica (sud della Spagna) a formare una Cintura Alpina che si estendeva lungo tutto il versante meridionale del Massiccio Ercinico. Durante l'Oligocene Inferiore, questa microplacca cominciò un movimento di rotazione in direzione sudorientale (Alvarez, 1974; Rosenbaum *et al.*, 2002a). Il bacino delle Baleari si aprì a seguito del movimento della microplacca, ma (ca. 20 Ma) la Corsica impattò contro la crosta degli Appennini ed arrestò il suo moto quasi del tutto. La restante parte della microplacca continuò la sua rotazione producendo una frattura che oggi corrisponde alle Bocche di Bonifacio, isolando dalla Corsica i territori della Sardegna e della Calabria. Analogamente, la Sardegna arrestò il suo moto circa 12 Ma fa, quando si scontrò con la regione tunisina del Nord Africa. Così, nel medio Miocene, da essa si separarono le odierne Calabria e Sicilia nordorientale (Alvarez, 1974) che continuarono a spostarsi in direzione sudorientale. Questa migrazione generò l'apertura del Mar Tirreno, ma essa avvenne in due momenti prima sul versante nord (ca. 9-6 Ma), poi su quello sud. Tra gli 8 e i 6 Ma, sul versante più occidentale del bacino del Mediterraneo si verificarono processi di subduzione che, associati all'abbassamento medio delle temperature globali, produssero la chiusura della connessione con l'Oceano Atlantico, innescando la cosiddetta Crisi di Salinità del Messiniano (Hsü, 1973; Krijgsman, 2002). Durante questo periodo, alla fine del Miocene (5,96-5,33 Ma), l'intero bacino del Mediterraneo si disseccò progressivamente poiché, perduto il contributo delle acque atlantiche, il suo regime idrico divenne negativo. Sebbene questo evento abbia avuto effetti drammatici di ridefinizione della distribuzione di acqua e terre emerse, esistono poche prove che dimostrino un suo ruolo determinante sul cambiamento del clima (Suc, 1984; Fauquette *et al.*, 1998). Ciononostante l'ampia disponibilità di terre emerse che si produsse influenzò non poco la distribuzione delle specie vegetali ed animali in tutta l'area.

La storia della separazione dei territori del Mediterraneo comincia quindi dal Miocene (ca. 25 Ma), con ovvi effetti sulla dispersione e l'eterogeneità delle specie ospitate. Nello stesso periodo le Kabylies migrarono rapidamente verso sud fino a collidere con il margine della placca africana. Anche la Cordigliera Betica arrestò il suo movimento fondendosi all'estremità sudorientale della penisola iberica. Al contrario, la Calabria e la Sicilia nordorientale proseguirono in direzione sudorientale fino al tardo Pliocene (2 Ma), quando trovarono pressappoco la posizione che mostrano ora (Thompson, 2005). Contestualmente, l'emersione dell'Appennino generata dai movimenti della placca Apulica ha arrestato il moto verso est delle microplacche. Si è così prodotta la fusione della Calabria con la penisola italiana e la compressione per subduzione della Sicilia nordorientale con la placca africana. L'emersione di una parte di questa ha costituito l'attuale territorio sudoccidentale della Sicilia e l'approfondimento che oggi è il Canale di Sicilia.

1.1.3 Storia paleoclimatica del Mediterraneo

La varia distribuzione dei territori continentali ed insulari, determinata dalla storia geologica del Mediterraneo, ha offerto lo scenario su cui hanno agito vigorose dinamiche climatiche, e queste a sua volta hanno rappresentato il fattore originario più importante per la definizione di condizioni ambientali ed habitat nuovi.

Durante il Miocene superiore (ca. 23 – 15 Ma), quando cominciarono i complessi movimenti delle microplacche del bacino, il clima dell'area mediterranea era fondamentalmente di tipo subtropicale, caratterizzato quindi da temperature mediamente superiori ai 15° C, e da precipitazioni intense nel periodo estivo, senza sostanziali alternanze stagionali di periodi caldi e freddi. Da questo momento in poi,

tutta la regione andò incontro ad una lunga fase di modificazione climatica che ridusse progressivamente i regimi idrici e le temperature, con effetti di vario genere in aree diverse del bacino. Tra i 9 e gli 8 milioni di anni fa, per l'intero bacino del Mediterraneo si produsse un progressivo fenomeno di inaridimento (Ivanov *et al.*, 2002; Fortelius *et al.*, 2006; Van Dam, 2006), innescato probabilmente dallo spostamento verso nord della Zona di Alta Pressione Subtropicale (Van Dam, 2006) e dalla chiusura del bacino sul suo versante orientale. In questa tendenza globale, l'influenza delle masse di aria umida provenienti dalle regioni atlantiche occidentali incrementò un gradiente di umidità decrescente verso est, che era comparso già attorno agli 11 Ma fa. In seguito, l'instaurarsi di un altro gradiente di umidità decrescente, stavolta da nord verso sud (ca. 7 - 5 Ma; Fortelius *et al.*, 2006), determinò una tendenza di inaridimento crescente da nordovest a sudest, che creò la base della modificazione delle cenosi mediterranee del Pliocene, e che è visibile ancora oggi nelle regioni mediterranee mediorientali drasticamente più aride e calde di quelle nordoccidentali. Tra i 6 e i 5 Ma fa, la crisi di salinità del Mediterraneo rappresentò il momento di svolta, almeno da un punto di vista cronologico, per l'instaurarsi dei parametri climatici che caratterizzano ancora oggi l'ambiente mediterraneo e che si aggiunsero agli effetti prodotti da un altro fattore importante di variabilità climatica, durato dalla fine del Miocene per tutto il Pliocene superiore (un periodo di ca. 4 Ma): l'abbassamento progressivo delle temperature medie (Fauquette *et al.*, 1998; Van Dam, 2006) che ha un suo ruolo importante nella modificazione delle cenosi vegetali che seguì.

A cavallo tra tardo Pliocene e Pleistocene superiore (ca. 3,5 - 1,8 Ma), raffreddamento ed inaridimento del clima produssero infatti l'estinzione di numerose specie di organismi in molte regioni. In qualche caso, interi generi, a volte rappresentanti unici di particolari famiglie, sparirono completamente da talune aree del Mediterraneo, a vantaggio di specie più settentrionali adatte alle nuove condizioni climatiche. Questo fenomeno rispecchiò l'andamento e la direzione dei gradienti

climatici, con estinzioni precoci a ovest e più tardive a est del bacino (Thompson, 2005). L'aridità, con l'abbassamento delle temperature, costituisce quindi il fattore chiave nella ridefinizione della composizione floristica mediterranea, che subisce in questo periodo un incremento marcato dei tassi di estinzione. Le condizioni climatiche stabilizzarono progressivamente quei caratteri che oggi riconosciamo come tipici del clima mediterraneo: una stagionalità marcata, fatta di estati torride e inverni temperati che si è affermata stabilmente intorno ai 3 Ma fa (Suc, 1984; Thompson, 2005).

Nelle epoche successive, dal Pliocene inferiore (ca. 2,5-2,1 Ma) in poi, le condizioni geoclimatiche del bacino del Mediterraneo non hanno registrato inversioni di tendenza, ma all'inaridimento e al raffreddamento dell'area si aggiunsero i cicli di ere glaciali e interglaciali che caratterizzano ancora oggi il Quaternario (da 2,4 Ma; Bertoldi *et al.*, 1989; Combourieu-Nebout, 1993; Thompson, 2005). Durante il Pleistocene, a causa di cambiamenti millenari dell'orbita terrestre (Hays *et al.*, 1976), si manifestò una prolungata serie di fluttuazioni climatiche che interessarono tutto il Quaternario evidente anche negli ultimi 1000 anni (Fig. 1.2).

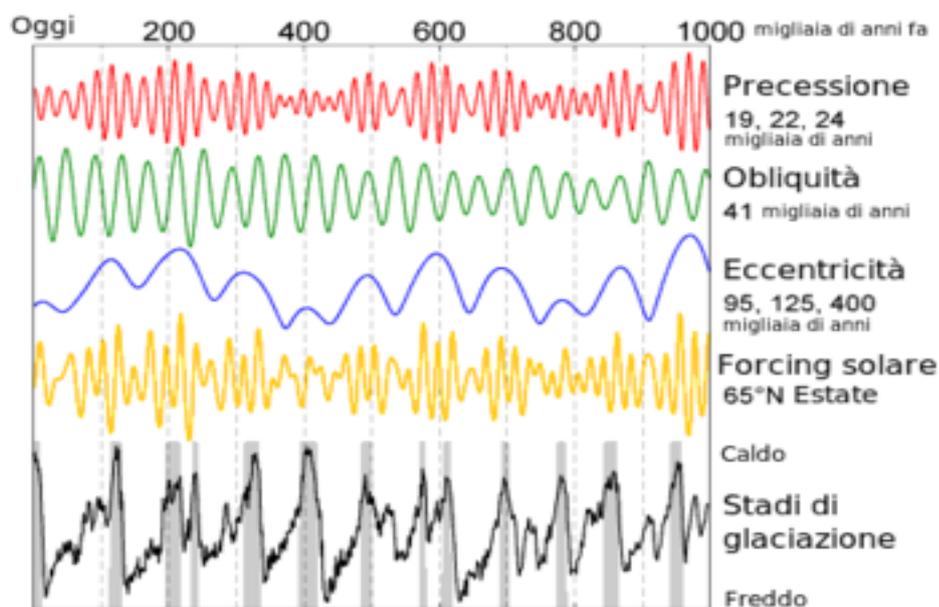


Figura 1.2. Oscillazioni climatiche di Milankovitch prodotte da variazioni cicliche dell'orbita terrestre.

Le prime calotte glaciali dell'emisfero nord iniziarono a crescere circa 2,5 Ma fa, e le alternanze tra fasi glaciali ed interglaciali investirono in modo ciclico le regioni più meridionali. Per queste regioni dominate dai ghiacci, quindi il Quaternario deve essere considerato come un'epoca complessivamente fredda, interrotta periodicamente da catastrofici eventi di incremento temporaneo della temperatura, caratterizzati da condizioni climatiche analoghe a quelle attuali (Davis, 1976). Di conseguenza la relativa stabilità climatica registrata durante gli ultimi 8000 anni va intesa come un'eccezione, e la distribuzione biogeografia attuale costituisce l'effetto di una fase interglaciale di tipo piuttosto raro nella storia dell'Europa e del Medio Oriente (Blondel & Aronson, 1999). I dati, prodotti da analisi paleo-climatiche effettuate nelle ultime decadi, hanno dimostrato come le alternanze tra glaciazioni e fasi interglaciali del Quaternario siano divenute particolarmente drastiche a partire da circa 700.000 anni fa. *Fasi glaciali* fredde ed aride, mediamente di durata pari a circa 100.000 anni, si sono alternate a periodi più brevi (circa 10-20.000 anni) caratterizzati da clima più caldo ed umido, le cosiddette *fasi interglaciali* (Shackleton *et al.*, 1973; Webb & Bartlein, 1992). Le oscillazioni periodiche espresse dai mutamenti climatici ciclici sono riconducibili a variazioni millenarie dell'inclinazione dell'asse terrestre (ca. 41.000 anni), dell'eccentricità dell'orbita (ca. 100.000 anni) e della distanza media annuale Sole-Terra (ca. 21.000 anni; Berger *et al.*, 1988). Questi fenomeni astronomici, noti come oscillazioni climatiche di Milankovitch (Fig. 1.2), dall'autore dell'opera seminale in materia (Milankovitch, 1941), sono considerate la forza determinante nei *pattern* di differenziazione tra specie, poiché influenzano le dimensioni degli areali, l'affermazione di specie poliploidi, come anche il grado di specializzazione e la capacità di dispersione degli organismi (Thompson, 2005). Attualmente il clima mediterraneo mostra temperature medie annue generalmente comprese tra i 14° e i 18°C, e gelate e precipitazioni nevose sono rare (localizzate sulle cime dei rilievi) o mancano del tutto. La piovosità media annua oscilla intorno a valori di circa 400-800 mm, ma è

concentrata nel periodo autunnale-invernale, mentre in primavera le precipitazioni diminuiscono fino a diventare molto rare nel periodo estivo. Se si analizzano singoli territori localizzati, si identificano però numerosi esempi di aree microclimatiche caratterizzate da regimi termici e idrici molto diversi e talvolta peculiari, che aggiungono eterogeneità di risorse e nicchie ecologiche. In questo contesto, le formazioni insulari, anche per l'effetto mitigante del mare che le circonda, offrono un'ampia varietà di gradienti ambientali su superfici relativamente ridotte.

Le isole maggiori del Mediterraneo infatti, in posizione centrale rispetto alle dinamiche filogeografiche, ospitano oggi cenosi di rara complessità, alla cui formazione contribuiscono sia le essenze relittuali dei rifugi glaciali, sia specie subtropicali di origine meridionale, nonché svariati *taxa* che dotati di capacità di dispersione su lunga distanza hanno dato luogo a nuove popolazioni in territori anche molto lontani da quelli originari: un tipico pattern mediterraneo frutto di differenziamento in numerosi endemismi e distribuzioni disgiunte.

1.1.4. Eventi biogeografici: Vicarianza

Lo studio della storia delle distribuzioni vegetazionali del Mediterraneo ha inizio già alla fine dell'800 con il contributo di de Saporta (1863) sulla vegetazione della Francia sudorientale durante il Terziario. Ad oggi, le informazioni più solide si basano sull'analisi delle frequenze di ritrovamento dei granuli pollinici associati agli strati sedimentari geologici, insieme alla datazione con il radiocarbonio di microfossili vegetali (Bessedik *et al.*, 1984; Thompson, 2005). Questi studi cercano di spiegare l'elevato numero di endemismi, e le complesse dinamiche di differenziamento che caratterizzano il Mediterraneo.

Lo scenario geodinamico della storia del Mediterraneo ha offerto la base per numerosi fenomeni di differenziamento e speciazione innescati da processi microevolutivi che hanno limitato o impedito del tutto il flusso genico, primo fra tutti l'isolamento geografico (Grant, 1971; Linder, 2003). La flora delle regioni mediterranee mostra infatti sistemi di popolazioni molto frammentati (Coates, 2000) e le numerose specie endemiche che le caratterizzano sono spesso distribuite in areali geografici limitati (Linder, 2003; Hopper & Gioia, 2004; Thompson, 2005), evidentemente per eventi di differenziamento localizzato. Il modello di speciazione localizzata è basato su due fasi di microevoluzione. Prima la deriva genica e il differenziamento casuale che essa produce forniscono nuovi fenotipi e varianti. Successivamente talune varianti comparse possono essere favorite dalla selezione naturale sulla base di vantaggi adattativi locali. Così la perdita e la fissazione casuali di alleli in zone disgiunte dell'areale di una specie gettano le basi per l'accumulazione di differenze genetiche, che a loro volta, sono soggette a *selezione distruttiva* (Mather, 1953a) lungo i gradienti ecologici, così tipici nel Mediterraneo.

Ecotipi o *sister species*, differenziati per caratteri più o meno marcati, occupano così nicchie ecologiche analoghe, in territori diversi, separati da barriere

geografiche che impediscono il flusso genico. Ciò è confermato da studi recenti su generi come *Cyclamen* (*Primulaceae*; Thompson *et al.*, 2005), *Saxifraga* (*Saxifragaceae*; Conti *et al.*, 1999) e *Senecio* (*Asteraceae*; Comes & Abbott, 2001), la cui frammentazione degli areali è stata messa in relazione proprio a gradienti ecologici esistenti. L'effetto complessivo è quello di numerosi casi di *vicarianza* tra i territori delle microplacche staccatesi e quelli continentali da cui si isolarono per effetto delle dinamiche tettoniche.

Il modello classico, di dispersione mediata da eventi geologici, prevede che le isole formate dalla frammentazione delle placche continentali siano caratterizzate da un'elevata proporzione di elementi relittuali (Gillespie & Roderick, 2002; Lomolino *et al.* 2006), che prendono il nome di *paleoendemismi*, provenienti dai bioti continentali originari. Al contrario, isole oceaniche di origine vulcanica dovrebbero ospitare un ampio numero di cosiddetti *neoendemismi*, derivati dalla colonizzazione *ex novo* di nicchie ecologiche nuove e disponibili (Gillespie & Roderick, 2002) che ne determinano differenziamenti adattativi specifici. Recenti analisi filogeografiche (Mansion *et al.*, 2008) ad esempio supportano un'origine relittuale per *Arum pictum* e *Helicodiceros muscivorus*, nel bacino del Mediterraneo. Questa conclusione è congruente con l'elevata presenza di paleoendemismi sulle isole che sono state fisicamente connesse alle placche continentali anche solo per brevi periodi della loro storia geologica, come Corsica, Sardegna, Baleari e Sicilia nordorientale. Le formazioni insulari del Mediterraneo, hanno offerto infatti condizioni di isolamento riproduttivo alle specie vegetali che, in modi e tempi diversi, hanno innescato fenomeni di differenziamento in endemismi. La *distribuzione disgiunta* di popolazioni o specie affini tra placche continentali e insulari è infatti una tipica caratteristica degli ecosistemi mediterranei (Thompson, 2005).

Nel bacino del Mediterraneo, i fenomeni di vicarianza descrivono *pattern* di sostituzione tra aree occidentali ed orientali comuni ad un numero rimarchevole di

coppie specie arboree, dette appunto *specie vicarianti*. Ad esempio, le due specie di pino mediterraneo più diffuse, il pino d'Aleppo (*P. halepensis*) ed il pino Calabro (*P. brutia*) sono rispettivamente presenti a occidente ed a oriente, e coesistono, producendo ibridi fertili, soltanto i isolati e ridotti distretti di Grecia, Turchia, e Libano (Barbéro *et al.*, 1998). Analogamente, *Juniperus thurifera* occidentale è sostituito da *J. excelsa* nel Mediterraneo orientale. Le distribuzioni disgiunte possono offrire scenari anche più complessi, come nel caso delle querce sempreverdi. Il leccio ad esempio, distribuito uniformemente ad occidente è vicariante della specie orientale *Quercus calliprinos*, ma presenta un differenziamento disgiunto ulteriore. Nell'ambito del distretto occidentale infatti, *Q. ilicis* è presente con un areale più orientale rispetto a *Q. rotundifolia*, diffuso nel sud ovest della Francia e in particolare in Spagna meridionale (Barbéro *et al.*, 1992). In condizioni del genere, diventa difficile descrivere le due entità tassonomiche come specie diverse, soprattutto se esse mostrano ibridazione in popolazioni di contatto come nel sud della Francia (Lumaret *et al.*, 1991; Michaud *et al.*, 1995). Simili pattern di vicarianza sono comuni anche in molte coppie di specie di alberi decidui, come *Pistacia terebinthus*, specie a diffusione occidentale e *P. palestina* tipicamente presente in areali mediorientali del bacino.

Numerosi esempi del genere (vedi Veilleumier, 1977 e Haffer, 1977) supportano la tesi che molti processi di speciazione allopatrica si siano verificati per vicarianza grazie all'isolamento di bioti in diverse epoche del passato. Laddove si verificano ibridazione tra le due specie vicarianti che coabitano zone cosiddette di *contatto secondario*, è inoltre possibile ipotizzare che esse siano ancora strettamente imparentate e che discendano da un ancestore comune recente (Blondel & Aronson, 1999). In questo schema di distribuzione di vicarianza tra occidente ed oriente, le grandi e piccole isole del Mediterraneo offrono condizioni di isolamento elevato e di rapido differenziamento, ma nondimeno costituiscono zone di contatto secondario per

coppie di specie che possono incontrarsi in queste aree centrali del bacino, dopo essere state separate da eventi geologici più o meno antichi.

1.1.5. Eventi filogeografici: Dispersione e movimento delle specie

Con la fine del Terziario, le glaciazioni cicliche che caratterizzarono il Pliocene avevano eliminato dal bacino del Mediterraneo gran parte delle specie non adatte a climi rigidi, e nello stesso tempo avevano consentito a quelle più settentrionali di utilizzare i territori meridionali che offrivano nuove nicchie climatiche prodotte dalla comparsa del clima temperato (Bessais & Cravatta, 1988). Successivamente, circa 3 Ma fa, cominciò a manifestarsi una marcata stagionalità annuale, che costituisce il connotato tipico del clima mediterraneo. La stagione arida progressivamente più lunga (Suc, 1984), accentuò drammaticamente la selezione dell'ambiente a favore di specie xeriche preesistenti e nuove che cominciarono a comporre un complesso mosaico vegetazionale (Suc, 1984; Combourieu-Nebout, 1993; Pons *et al.*, 1995).

In questo quadro generale, la fase storica più determinante per spiegare le attuali distribuzioni vegetali nel Mediterraneo va identificata però negli eventi climatici che caratterizzarono il Pliocene e il Quaternario in modo particolare, quando la complessità vegetale subì ripetute contrazioni di areali, associate ad elevati tassi di estinzione e successive espansioni che ciclicamente seguirono *pattern* piuttosto costanti. Dispersioni e movimenti di popolazioni seguirono gli andamenti climatici e si distribuirono su areali caratterizzati da eterogeneità ambientale che aiutò lo sfruttamento di nicchie ecologiche nuove e lo sviluppo di differenziamenti localizzati. Le distribuzioni vegetali del bacino mediterraneo sono sostanzialmente frutto di fenomeni espansivi avvenuti a partire dall'ultima fase interglaciale, che inizia circa

13.000 anni fa (Fig. 1.3). Questo significa che le componenti floristiche del biota attuale hanno una storia comune di poche migliaia di anni soltanto, come dimostrato per diversi *taxa* arborei (McGlone, 1996). Ciononostante, *taxa* diversi hanno subito medesime pressioni selettive imposte dalle ciclicità climatiche del Pleistocene.

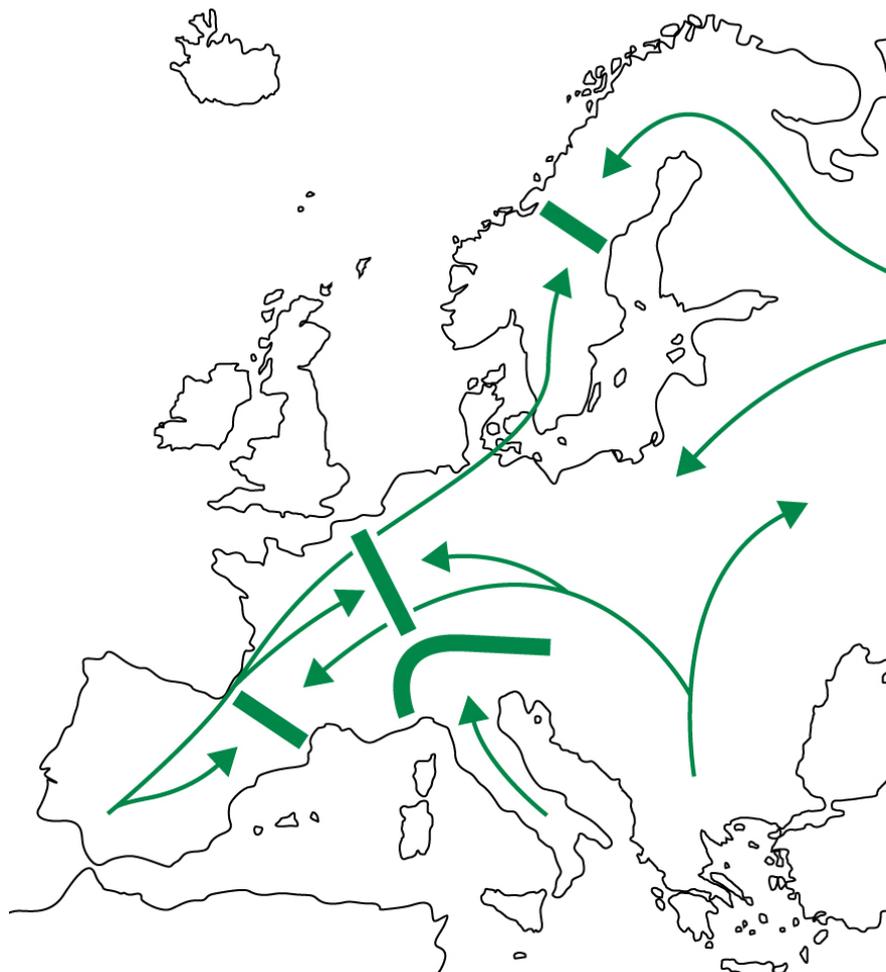


Figura 1.3. Rotte di espansione postglaciale nel territorio europeo. Le frecce indicano le principali direzioni di migrazione. Le linee spesse rappresentano barriere all'espansione prodotte da catene montuose.

Gli effetti sulle dinamiche di dispersione sono definiti col nome collettivo di *Dinamiche di distribuzione delle specie indotte dall'orbita* (ORD – Orbitally forced species' Range Dynamics; Dynesius & Jansson, 2000). L'entità delle ORD varia nel tempo e nello spazio, ma costanti sembrano essere gli effetti sia sulla composizione in

specie che sugli adattamenti: deprimono i processi di speciazione graduale (cioè per accumulo lento e progressivamente divergente di variabilità genetica; Cwynar & MacDonald, 1987), incrementano le dimensioni degli areali e il tasso di specie prodotte da poliploidizzazione o dalla comparsa di altre barriere istantanee al flusso genico, inoltre producono una selezione contraria alla specializzazione e favoriscono meccanismi di dispersione a lunga distanza. Poiché le ORD hanno effetti più marcati con l'aumento di latitudine, esse hanno inoltre prodotto *pattern* di distribuzione longitudinali nella diversità in specie e nelle dimensioni degli areali delle specie (Dynesius & Jansson, 2000) che nel Mediterraneo si sono divisi tra gli ampi territori dalla complessa storia geoclimatica.

Questo modello prevede fenomeni di estinzione o estrema contrazione a carico delle popolazioni vegetali europee centro-settentrionali, che durante le fasi fredde “glaciali”, non avrebbero resistito al cambiamento climatico. Sul versante meridionale invece, il bacino del Mediterraneo offriva a numerose specie di piante la possibilità di sopravvivere durante le fasi glaciali in aree in cui le condizioni climatiche erano meno stringenti. Rilievi montuosi e luoghi umidi dell'Europa meridionale divennero così gli habitat ideali per le piante stenoterme settentrionali, assumendo il ruolo di *rifugi glaciali*. Da queste aree, le specie furono in grado di espandere successivamente il proprio areale durante le fasi interglaciali, grazie a nuovi habitat resi disponibili dall'addolcimento delle temperature. Dall'analisi di dati orografici, climatici e vegetazionali, si evince uno schema preciso che descrive le dinamiche della ricolonizzazione delle aree centro-settentrionali d'Europa da parte delle specie vegetali provenienti dalle aree più meridionali, avvenuta in modo ripetuto nelle ere interglaciali (Comes & Kadereit, 1998; Bennett *et al.*, 1991). Durante le fasi glaciali, i territori meridionali offrivano condizioni ecologiche simili a quelle riscontrabili nelle aree settentrionali durante le fasi interglaciali e diedero luogo ai *rifugi glaciali* identificati nella penisola italiana, in quella iberica e in Grecia: aree in cui durante le glaciazioni

sopravvissero diverse specie ad adattamenti più temperati tipiche delle regioni settentrionali. Si ritiene che l'attuale distribuzione vegetazionale mediterranea sia prevalentemente dovuta alla variazione climatica impressa dall'ultima grande glaciazione lungo un periodo che va dai 115.000 ai 10.000 anni (Bond *et al.*, 1993; Fig. 1.4).

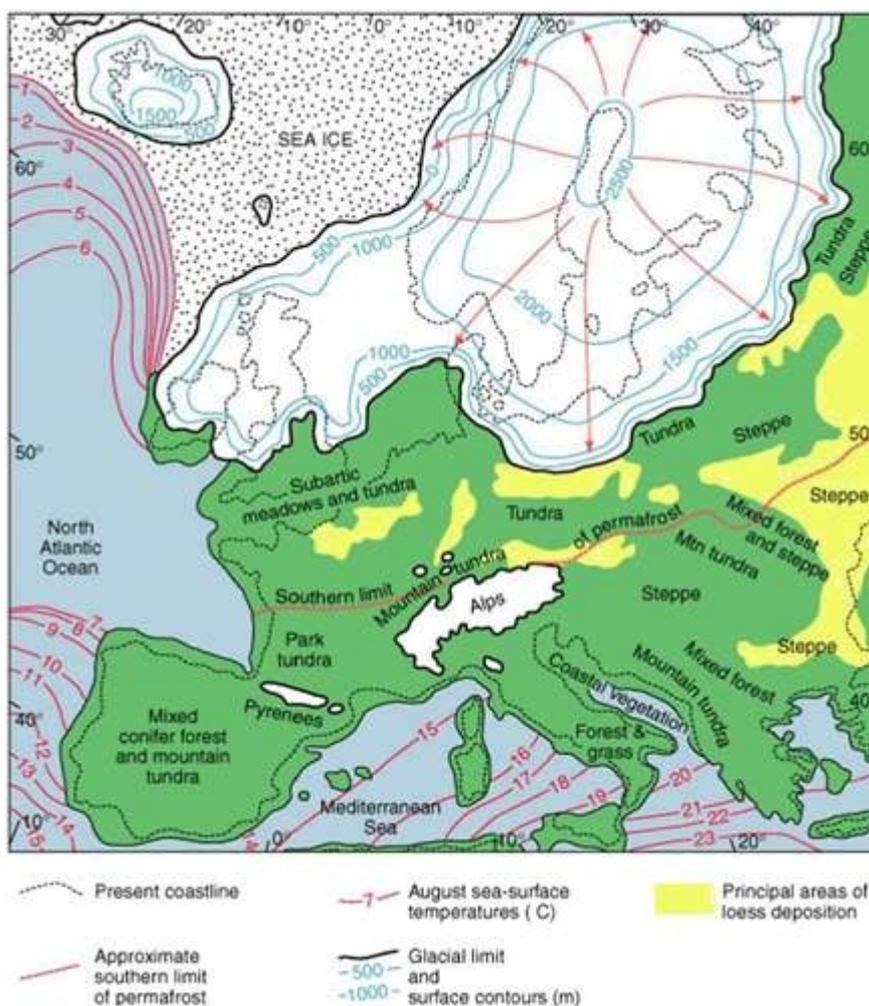


Figura 1.4. Estensione della calotta glaciale continentale che copriva l'Europa settentrionale circa 20'000 anni fa con isoterme delle temperature estive sul livello del mare in gradi Celsius.

Durante l'ultima fase glaciale (Würmiano), le specie settentrionali sono state spinte nelle aree rifugio meridionali, entro però i limiti di barriere geografiche insormontabili, come le catene montuose del versante meridionale dell'Europa o lo stesso mar Mediterraneo. La conformazione frastagliata della costa, con numerose

penisole ad estensione meridionale, ha offerto inoltre lo scenario per una frammentazione degli areali, producendo popolazioni distinte e localizzate della stessa specie, e limitando o annullando del tutto il flusso genico tra loro (Blondel & Aronson, 1999). L'Europa centrale era dominata da un clima comparabile a quello della Siberia settentrionale odierna, e l'Europa meridionale era completamente ricoperta di foreste (Fig. 1.4).

Con l'insorgere della fase interglaciale, all'inizio dell'Olocene, questo fenomeno si arrestò, poiché si resero disponibili nuove aree con condizioni termiche più elevate. L'isolamento nei *rifugi glaciali*, e la successiva migrazione espansiva interglaciale hanno determinato direttamente la distribuzione della variazione genetica delle popolazioni interessate, e ciò è tanto più evidente nella composizione vegetale attuale, frutto del ciclo più recente di glaciazione. L'ultima delle glaciazioni del Quaternario infatti, durata da circa 120.000 a 13.000 anni fa (Comes & Kadereit, 1998), ha lasciato tracce evidenziate da studi con marcatori genetici effettuati su un numero sempre maggiore di *taxa* (Abbot *et al.*, 2000). Mentre studi palinologici confermano l'esistenza di rotte specifiche nelle espansioni postglaciali di specie vegetali, consolidando e caratterizzando in modo sempre più specifico questo modello biogeografico (Bessedik, 1985).

Si può riconoscere una linea di tendenza generale nelle modificazioni vegetazionali verificatesi in questo periodo. Le condizioni climatiche più calde indussero infatti un generale spostamento degli areali di distribuzione dalle regioni meridionali verso quelle settentrionali del Paleartico. E' questa in effetti una dinamica espansiva comune a tutte le fasi interglaciali, durante le quali molte specie spinte a sud dall'avanzare dei ghiacci della fase glaciale, espandono molto rapidamente i loro areali guadagnando progressivamente i territori più settentrionali disponibili. Ciò che colpisce da studi palinologici, incrociati con analisi del radiocarbonio, è proprio la rapidità con cui queste espansioni sono avvenute, come nel caso dei generi di alberi

oloartici *Corylus* e *Quercus*. In meno di 12.000 anni dalle aree rifugio meridionali hanno occupato progressivamente tutto il territorio centro europeo, ad un tasso stimato mediamente per le foreste decidue pari a circa 100-1000 m all'anno (Huntley & Birks, 1983). Non va dimenticato inoltre che le condizioni ambientali generate delle aree boschive, promuovevano anche una espansione parallela di tutte le specie erbacee ad esse associate, secondo pattern di dispersione spesso complessi di cui si hanno oggi solide evidenze.

Sul versante meridionale del bacino mediterraneo invece, questa tendenza espansiva da sud a nord interessava specie ad adattamenti più xerici. Queste cominciarono a competere per i territori più settentrionali con le specie temperate che vi si erano precedentemente rifugiate, relegando queste in areali diversi da quelli originari, spesso di estensione ridottissima e molto localizzati, in cui permangono tuttora microhabitat adeguati. L'insieme di specie capaci di ricolonizzare le terre liberate dai ghiacci nell'Olocene, è determinato da diversi fattori: la tolleranza climatica, le capacità di dispersione di cui sono dotate, nonché la distanza da percorrere tra i rifugi glaciali e gli habitat adatti alla loro espansione (Bullini *et al.*, 1999). Ciò si traduce in una molteplicità di rotte di dispersione che dipende dalle specifiche capacità dispersive della specie in relazione alla disponibilità di corridoi di migrazione ecologicamente adatti. La distribuzione delle specie arboree europee è stata studiata sia attraverso analisi palinologiche che filogeografiche basate sull'analisi del DNA plastidiale. Le mappe polliniche delle querce decidue, ad esempio hanno identificato rifugi glaciali nella penisola iberica, in Italia e nei Balcani (Huntley & Birks, 1983; Bennett *et al.*, 1991), e studi molecolari hanno confermato questo risultato (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Ferris *et al.*, 1998). Se però le analisi palinologiche suggerivano per le Alpi un ruolo di barriera all'espansione della popolazione italiana (Huntley & Birks, 1983), gli studi genetici hanno dimostrato che la popolazione italiana è riuscita a superare l'arco alpino e a colonizzare aree dell'Europa centrale. Studi degli allozimi in

Abies alba, sembrano confermare la medesima rotta per le popolazioni dei rifugi dell'Italia peninsulare (Konnert & Bergmann, 1995). Anche per *Fagus sylvatica*, ora ampiamente distribuito in tutta Europa, le mappe fossili hanno evidenziato aree rifugio in Calabria e nei Carpazi (Huntley & Birks, 1983), suggerendo due rotte di colonizzazione possibili postglaciali: una a occidente e l'altra a oriente della catena alpina. Ma studi con marcatori plastidiali hanno chiarito che l'intera popolazione di faggio europea deriverebbe soltanto dall'area rifugio dei Carpazi e che le popolazioni geneticamente differenti presenti in Italia non avrebbero mai superato le Alpi (Demesure *et al.*, 1996). Simili evidenze di isolamento delle popolazioni rifugiali italiane, si sono ottenute anche per altre specie, come *Alnus glutinosa* (King & Ferris, 1998).

Il caso di due specie di *Saxifraga*, una Scandinava e l'altra proveniente da un'isola delle Svalbard, è particolarmente interessante. Si riteneva infatti che quelle regioni fossero aree rifugio, ma analisi molecolari e reperti macrofossili hanno dimostrato, come queste popolazioni siano sopravvissute al di fuori della calotta polare europea, migrando successivamente verso nord quando le condizioni lo permisero. Gli studi basati su variabilità degli allozimi e del DNA plastidiale, oltre a precisare l'esistenza di aree rifugio e le rotte lungo le quali si sarebbero svolte le ricolonizzazioni degli areali settentrionali, riescono a suggerire anche l'esistenza di aree rifugio di fatto sconosciute, come in Francia sudorientale e in Calabria per *Abies alba* (Konnert & Bergmann, 1995), o la Spagna meridionale e la Turchia per *Alnus glutinosa* (King & Ferris, 1998), attraverso l'identificazione di popolazioni localizzate dotate di elevata diversità molecolare e tassi elevati di alleli unici o aplotipi plastidiali.

Questi risultati indicano che il numero di rifugi glaciali può essere sottostimato dalla pura analisi dei fossili, ma ciononostante dimostrano quanto sia importante incrociare le evidenze analitiche provenienti da ambiti di indagine diversi per tracciare

le rotte molteplici dinamiche di dispersione seguite da specie diverse in base alle disponibilità ecologiche delle diverse fasi storiche (Comes & Kadereit, 1998).

L'uso di marker genetici in combinazione con i ritrovamenti di polline negli strati geologici sedimentari, in concordanza con i modelli di fluttuazione climatica sopra descritti, dimostra l'esistenza di rifugi glaciali pleistocenici nell'area mediterranea (Italia, Grecia, Balcani, Spagna meridionale) per numerose specie di alberi tipici delle foreste temperate centroeuropee (Taberlet *et al.*, 1998). Sulla base dei pattern di distribuzione genetici tra le aree rifugio e la struttura spaziale di diverse popolazioni europee è stato possibile ricostruire le rotte di colonizzazione (Taberlet *et al.*, 1998) e le modalità più probabili di ricolonizzazione (Petit *et al.*, 1997) per molte specie arboree. A sostegno di questo modello, è molto significativo che molte di queste specie mostrino livelli di polimorfismo maggiori nelle aree rifugio mediterranee rispetto alle aree più settentrionali di ricolonizzazione e che queste ospitino solo una frazione della variabilità genetica delle aree rifugio. Queste evidenze sono spiegabili con l'isolamento e il differenziamento per deriva genica, seguiti alla frammentazione delle distribuzioni in aree rifugio caratterizzate da habitat differenti (Thompson, 1999). Anche ai *taxa* erbacei ad ampia diffusione si possono applicare questi modelli dispersivi, a patto di prendere in considerazione le associazioni vegetazionali su un'ampia scala temporale, piuttosto che soltanto i pattern di flusso genico attuali. Nel caso del differenziamento tra le popolazioni di *Senecio gallicus* ad esempio, i confronti tra allozimi e variabilità del DNA plastidiale dimostrano che l'attuale popolazione ampiamente distribuita lungo il versante europeo meridionale è frutto dell'espansione postglaciale a partire da rifugi glaciali pleistocenici distinti, i cui differenziamenti hanno lasciato tracce evidenti nei pattern enzimatici e genetici (Comes & Abbot, 2001). Si è osservata infatti una riduzione nella diversità aplotipica delle popolazioni delle aree continentali interne rispetto alle popolazioni costiere di Spagna e Portogallo, prodotta probabilmente dall'effetto fondatore. Queste evidenze sottolineano quindi l'importanza

delle associazioni storiche tra popolazioni vegetali nella genesi dell'architettura genetica di specie con capacità di dispersione dei semi su lunga distanza. In altre specie di *Senecio*, come *S. glaucus* e *S. ruderalis*, un piccolo numero di popolazioni sembra aver subito un impedimento allo scambio di geni citoplasmici con altre popolazione, producendo un differenziamento in entità evolutive distinte. Tali differenziamenti possono indurre popolazioni diverse a seguire direzioni evolutive diverse (Strand *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1999). Nondimeno, è possibile rinvenire aree di contatto secondario tra sottospecie affini, che essendosi differenziate in una fase di isolamento, si espandono successivamente in un areale comune a partire da due regioni di origine differenti. E' questo ad esempio il caso di *Ecballium elaterium* in Spagna, in cui due sottospecie, che formano una zona di contatto nella Spagna centromeridionale, hanno tra loro similarità genetica minore di quella riscontrata tra altre popolazioni presenti in areali distinti e lontani (Costich & Meagher, 1992). In condizioni parapatriche simili inoltre, fenomeni di ibridazione possono ridurre il differenziamento tra *taxa* affini, con l'effetto di una omogeneizzazione genetica, come in *Senecio* del Mediterraneo orientale, dove la similarità atipica riscontrata insieme ad una divergenza tra gli allozimi, è stata interpretata come effetto di introgressione genica avvenuta in una zona di contatto secondario (Comes & Abbot, 1999).

1.2 La cladogenesi e i meccanismi di speciazione

1.2.1 Speciazione allopatrica

Il modo più efficace per impedire il flusso genico con una popolazione parentale, più ampia, è che una piccola frazione di essa si separi geograficamente, isolandosi totalmente dalla popolazione d'origine: questo particolare processo evolutivo viene definito, appunto, *speciazione allopatrica*. La separazione può avvenire in modi diversi: può essere il risultato dell'emigrazione attiva di un piccolo gruppo di individui dall'areale della popolazione parentale, oppure il risultato di una trasformazione ambientale come la modificazione di un corso d'acqua, o le variazioni delle quote marine, o anche l'impatto antropico o in fine la presenza di barriere fisiche quali catene montuose, deserti, oceani, etc. A seguito della separazione il gruppo di individui isolato può evolvere meccanismi di isolamento riproduttivo che impediscono il flusso genico con gli individui della popolazione d'origine e con altre popolazioni. Questi meccanismi possono interessare le fasi precoci del processo di accoppiamento (pre-zigotici) o quelle tardive del processo riproduttivo (post-zigotici) e possono riguardare morfologia, fisiologia, comportamento, anche con contributi contemporanei di questi tre aspetti. In allopatria inoltre, mutazioni casuali che si accumulano gradualmente possono portare alla formazione di due specie distinte anche senza selezione naturale divergente o deriva genica, laddove però la separazione geografica si protragga per periodi di tempo sufficientemente lunghi. In questo caso, quando venisse meno la barriera fisica tra gli individui delle due popolazioni, questi possono risultare incapaci di reincrociarsi identificandosi così in due specie distinte (Mayr, 1940).

Un caso particolare di isolamento geografico è quello dei cosiddetti "isolati periferici", considerati come unità evolutive di grande importanza per i fenomeni di speciazione da molti autori. Lo stesso Darwin, aveva assegnato loro il nome di *specie incipienti*. Queste unità riproduttive, essendo isolate in condizioni di *allopatria*, sono protette da scambi genici con la popolazione d'origine, e essendo costituiti da un numero spesso molto limitato di individui, l'effetto fondatore prima e la deriva genica poi possono produrre differenziamenti rapidi e caratterizzanti. Gli isolati periferici, infine, sono stati identificati in ambienti in cui è forte la pressione selettiva per quei caratteri che li differenziano dalla popolazione originaria: la distribuzione di una specie, infatti, è limitata ad areali i cui limiti periferici corrispondono a zone in cui le condizioni ambientali sono più sfavorevoli. E superare quei limiti geografici significa di solito evolvere adattamenti a condizioni ecologiche mutate. Isolati periferici tuttavia non significa necessariamente "specie nascenti". Più probabilmente infatti, le avverse condizioni conducono questi gruppi marginali a ridursi fino all'estinzione. In particolare, per una popolazione di piccole dimensioni il fatto di costituire un isolato periferico equivale semplicemente ad avere la possibilità di differenziarsi ed affermarsi come nuova specie, ma le probabilità che ciò accada sono scarsissime (Luria *et al.*, 1981). In realtà, l'interpretazione più comune attualmente vede gli isolati periferici più come un prerequisito facilitante il processo della speciazione piuttosto che un fattore determinante della stessa. Oggi infatti si tende ad attribuire un ruolo cardine all'azione della selezione naturale piuttosto che all'effetto fondatore e/o insorgenza di mutazioni. Infatti si è accertato che la speciazione avviene spesso come effetto secondario della azione differente della selezione naturale nelle popolazioni periferiche rispetto a quelle "centrali" nell'areale di una specie. Più specificamente, l'azione della selezione (divergente) avrebbe un effetto diretto sui geni coinvolti nell'adattamento locale e solo indirettamente essa influenzerebbe anche quei geni, coinvolti nelle attitudini

riproduttive, che associati ai primi divergerebbero insieme ad essi fino a generare un isolamento riproduttivo tra due gruppi.

La speciazione allopatrica rimane comunque l'unica forma di speciazione comunemente accettata senza riserve, soprattutto grazie all'enorme mole di dati che sostengono questo modello provenienti da studi condotti su isole del Pacifico (Galapagos, Hawaii, Samoa, etc.) in cui le condizioni di isolamento sono indiscutibili. La speciazione allopatrica si basa quindi sull'esistenza di *barriere geografiche* che separino due popolazioni di individui della stessa specie in due territori differenti, definite *isole*, anche quando non si tratti di reali isole geografiche. In questo caso possono costituirsi le condizioni di isolamento parziale, che vengono definite *parapatricia* (Coyne & Orr, 2004). Non sempre però l'isolamento geografico genera isolamento riproduttivo. Nel regno vegetale sono noti molti esempi di specie che mantengono la loro integrità attraverso barriere geografiche, e quindi in allopatria. Wang *et al.* (1997) hanno studiato due specie appartenenti alla famiglia delle Asteraceae: *Artemisia tridentata* subsp. *tridentata* ed *A. tridentata* subsp. *vaseyana*. Queste due sottospecie crescono nel nord dello Utah ad altitudini differenti e, nelle zone di simpatria (a quote intermedie) formano spesso zone di ibridazione. Per verificare se le due entità fossero isolate tra loro da parametri ecologici, fu allestito un esperimento di coltivazione in condizioni uguali (*common garden*) da cui risultò che, sia l'ibrido che i parentali, mostravano un maggiore successo riproduttivo se cresciute nel suolo proveniente dal loro habitat originario. Dunque, sebbene fosse stata identificata anche una barriera postzigotica (ibrido sterile), la distinzione altitudinale degli areali delle due entità era causata da un adattamento locale e costituiva quindi un esempio chiaro di isolamento ecologico.

1.2.2 *Speciazione simpatica*

La speciazione simpatica è specificamente definita come l'emergere di due specie distinte a partire da una popolazione in cui l'accoppiamento è casuale rispetto al luogo di nascita dei partner (Smith, 1966; Gavrilets, 2003), quindi in presenza di flusso genico. Essa è quindi il fenomeno per cui i membri di una popolazione, non isolati geograficamente tra loro, si evolvono in specie distinte. Al contrario che nella speciazione allopatrica, in simpatria la formazione di nuove specie avviene quindi in presenza di flusso genico. In questo caso, la forza cruciale che guida il differenziamento tra gli individui di una popolazione è infatti l'azione divergente della selezione naturale.

Essa consiste quindi nella comparsa di isolamento riproduttivo tra popolazioni (o individui) senza che vi sia un effettivo isolamento geografico. I processi che conducono a questa condizione vengono comunemente divisi in due categorie teoriche, distinte in base ai tempi e ai modi di azione della selezione e definite rispettivamente:

- speciazione simpatica graduale
- speciazione simpatica istantanea (*quantum speciation*)

Al di là delle specifiche modalità in cui la speciazione simpatica può teoricamente attuarsi, rimangono comunque dubbi profondi sul suo reale contributo ai fenomeni di speciazione in generale. E le posizioni controverse di numerosi ricercatori, sono ancora suffragate da un numero insufficiente di evidenze sperimentali. In ultima analisi, è davvero possibile che, indipendentemente da barriere fisiche, due o più gruppi di una popolazione tendano spontaneamente a divergere l'uno dall'altro senza

che vi sia alcun impedimento al flusso genico tra loro? Cioè, sono realmente plausibili modelli di speciazione in simpatria? Queste ed altre domande simili hanno occupato, e occupano ancora, il campo delle speculazioni teoriche in materia di speciazione da circa 40 anni (Gavrilets, 2003).

In effetti, la plausibilità che eventi di speciazione possano verificarsi anche in presenza di flusso genico è stata oggetto di numerosi dibattiti e polemiche. Questa possibilità è accettata quasi universalmente, ma esempi chiari di speciazione simpatica sono ancora talvolta controversi e poco numerosi, e il modello è stato spesso scartato, in parte a causa di difficoltà teoriche (Coyne, 1992; Rice & Hostert, 1993). Inoltre molti modelli di analisi della speciazione simpatica sono stati sviluppati prendendo in esame solo aspetti particolari del problema e ignorandone altri (Smith, 1966; Bush, 1994).

Nonostante le obiezioni cui si è precedentemente accennato, modelli matematici recenti dimostrano che la speciazione simpatica è un evento plausibile (Dieckmann & Doebeli, 1999; Tregenza & Butlin, 1999; Gavrilets, 2003) ma pochi esempi validi sono al momento documentati (Schliwen *et al.*, 2000; Filchak *et al.*, 2000; Savolainen *et al.*, 2006).

La condizione più comunemente riscontrata in natura è quella di speciazione simpatica graduale. In questa modalità di speciazione, i cambiamenti genetici non conferiscono un immediato isolamento riproduttivo. In un primo momento, cioè, si instaurano meccanismi di isolamento debole e solo successivamente compaiono meccanismi progressivamente più efficienti, favoriti e guidati dalla selezione naturale. Ad esempio, due gruppi di individui della medesima specie possono vivere in stretta simpatria, e contemporaneamente mostrare stagioni riproduttive sfasate nel tempo; così gli individui di uno non possono mai incrociarsi con quelli dell'altro sebbene siano ancora fisiologicamente interfecondi. Successivamente gli adattamenti ai due periodi riproduttivi distinti diventano più specifici per effetto della selezione (divergente),

conducendo, non istantaneamente ma progressivamente, a differenziamenti secondari e alla loro fissazione differenziale nelle due specie nascenti.

Infatti la speciazione simpatica è stata rilevata principalmente in specie parassite che, a seguito di mutazioni casuali, possono cambiare la loro specificità parassitaria per un dato ospite. La popolazione originaria, cioè, si frammenta in due gruppi con preferenze per ospiti diversi. E gli individui di un gruppo tendono quindi a riprodursi preferenzialmente tra loro. Ciò genera un isolamento riproduttivo, progressivamente rafforzato dalla selezione divergente, che guida ad adattamenti via via più specializzati tra i due gruppi di individui.

Un esempio ci arriva dal caso di due varietà di *Ragoletis pomnella*, una mosca parassita del melo e del biancospino, che si sono separati, ma in simpatria, su queste due differenti piante ospiti e che differiscono nel comportamento riproduttivo e nei periodi di accoppiamento (Bush, 1994). Ancora, uno studio genetico su uccelli africani, parassiti specie-specifici di nidi, appartenenti alla famiglia *Viduidae*, ha dimostrato come essi si siano specciati simpaticamente dopo la colonizzazione di nuovi ospiti (Sorenson *et al.*, 2003).

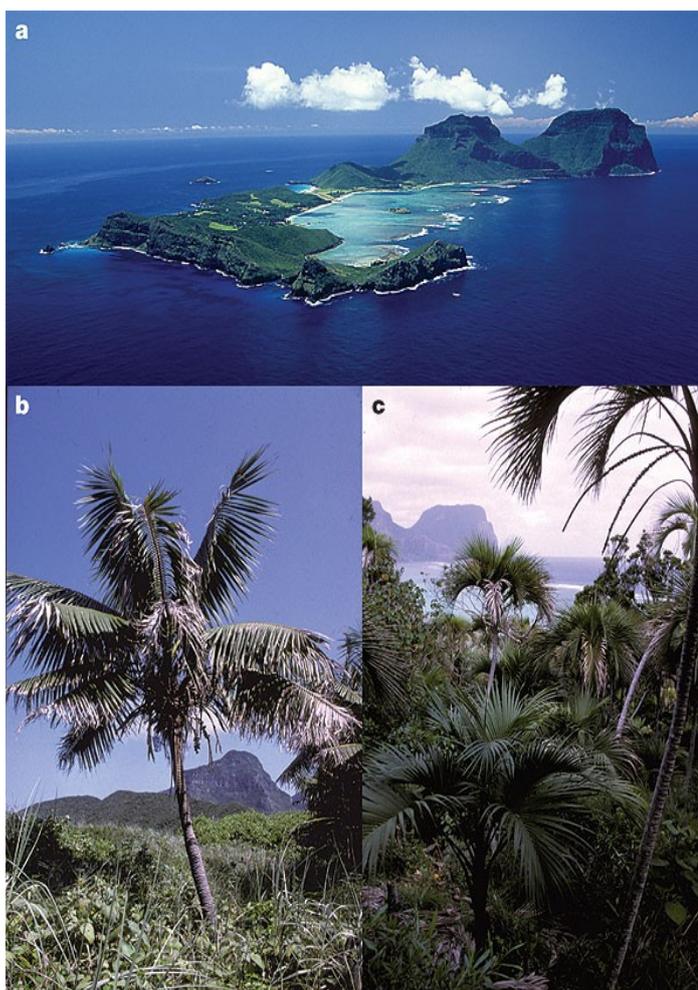


Figura 1.5. Lord Howe Island (a), areale delle due sister species *Howea forsteriana* (b) e *H. belmoreana* (c) nate da speciazione simpatica.

In ambito botanico, invece, esemplare è il caso di speciazione simpatica avvenuta sulla piccola isola oceanica di Lord Howe, distante più di 500 km dalla costa australiana, in cui le palme subtropicali *Howea forsteriana* e *H. belmoreana* (*Areaceae*) si sono separate a partire da un ancestore comune subito dopo il suo arrivo sull'isola (Fig. 1.5). Come dimostrato da indagini ecologiche e molecolari, in questo caso differenti composizioni del suolo in zone diverse dell'isola hanno indotto un differenziamento nel periodo di fioritura tra due gruppi di individui, che hanno poi subito divergenze progressive, guidate dalla selezione, fino a divenire due specie distinte (Savolainen *et al.*, 2006).

Nonostante queste evidenze, comunque limitate ad ambiti ristretti e condizioni particolari, le controversie rimangono ancora aperte, e diversi autori contestano il modello di speciazione simpatica al livello delle sue fondamenta teoriche. Da questo punto di vista, infatti, è molto improbabile che due specie affini possano coesistere in maniera ottimale nello stesso areale, utilizzando nicchie ecologiche identiche (principio di esclusione competitiva di Volterra-Gause; Hardin, 1960). Gli unici esempi di speciazione simpatica registrati sono, infatti, proprio quelli in cui, per effetto della selezione, si è prodotto inizialmente uno *shift* ecologico in un gruppo di individui della popolazione originaria. Gli eventuali incroci tra individui dei due gruppi vengono soppressi dalla stessa selezione, e i due insiemi di individui restano così distinti uno dall'altro.

L'unica condizione di speciazione in simpatria, comunemente accettata senza riserve, che si verifica senza *shift* ecologici iniziali, è quella della speciazione istantanea per effetto di aberrazioni cromosomiche comparse improvvisamente.

Nella speciazione simpatica istantanea, una barriera al flusso genico tra alcuni individui ed il resto della popolazione viene a formarsi pressoché istantaneamente, per la comparsa improvvisa di una o più mutazioni che isolano riproduttivamente e geneticamente due gruppi distinti di individui. In questa

condizione la speciazione si verifica solo se esistano pressioni selettive tali da limitare il flusso genico prodotto dagli incroci tra i mutanti e il resto della popolazione.

In questo caso un evento puntuale, identificato univocamente, compromette, nell'arco di una o poche generazioni, lo scambio genico tra un gruppo di individui e la popolazione rimanente, per l'innalzamento di barriere riproduttive fisiologiche come la perdita di compatibilità cromosomica tra gameti. Una condizione del genere non necessita di divergenze negli adattamenti ecologici per determinare isolamento riproduttivo, producendo di fatto un'efficace barriera al flusso genico tra i gruppi.

Ad esempio, laddove un'aberrazione cromosomica produca un genoma aneuploide compatibile con la sopravvivenza dell'organismo, verrà compromessa la compatibilità riproduttiva con gli individui parentali, generando di fatto una barriera istantanea al flusso genico tra essi. Quando una simile aberrazione coinvolge l'intero genoma, attraverso la duplicazione complessiva dell'intero set cromosomico, la probabilità che l'organismo che la presenta risulti ancora vitale può essere elevata, soprattutto in ambito vegetale. Si dà così vita ad un nuovo insieme di individui, tra loro interfecondi, ma isolati riproduttivamente dai loro parentali, sebbene ancora in simpatria con essi.

E' questo il caso della poliploidia, che nel tempo di una sola generazione dà luogo a individui vitali, normalmente tra loro interfecondi, ma riproduttivamente incompatibili con i parentali, con i quali continuano a condividere l'areale e la nicchia ecologica, e con cui innescano talvolta dinamiche anche complesse di competizione selettiva tra la popolazione poliploide di nuova formazione e quella diploide parentale. Nonostante la grande varietà di condizioni descritte dai contributi scientifici negli anni, la poliploidia rappresenta al momento l'unica modalità comunemente accettata di speciazione simpatica, definita appunto *speciazione per poliploidia*. Questa, per le peculiarità cui si è accennato in precedenza, per la varietà di aspetti che la

caratterizzano, e per i numerosi esempi riscontrati in natura, merita una trattazione particolareggiata.

1.2.3 *La poliploidia*

La poliploidia, un determinante fattore di speciazione ed evoluzione nelle piante, e in modo meno comune negli animali, è associata con fenomeni di ibridazione intra ed inter-specifica (Levin, 1983). In termini essenziali, la poliploidia è la presenza, nel genoma di un organismo, di un numero di cromosomi pari ad un multiplo intero del numero di cromosomi caratteristico per la specie di quell'organismo (Grant, 1981). La poliploidia è stata definita anche come il possesso di tre o più set completi di cromosomi ed è stata un'importante caratteristica dell'evoluzione cromosomica in molti *taxa* eucariotici, incluse piante, lieviti, insetti, anfibi, rettili, pesci ed anche mammiferi (Ramsey & Schemske, 1998). La poliploidia è molto comune, almeno in certa misura, nella maggior parte dei membri del regno vegetale, in modo più marcato in alcuni e più raro in altri (Stebbins, 1950). Il fatto che sia così diffusa in molte piante è esemplificato dall'ampia variazione del numero cromosomico, da $2n=4$ a 500 nelle angiosperme, e da $2n=6$ a 226 nelle monocotiledoni (Grant, 1981), con migliaia di angiosperme che posseggono da 14 a 15 coppie di cromosomi (Grant, 1981). Uno dei primi esempi registrati di poliploidia naturale è quello delle mutazioni di De Vries in *Oenothera lamarckiana* (mutat. *gigas*) (Ramsey & Schemske, 1998). Il primo caso di poliploide artificiale è stato descritto nel 1916 da Winkler, che lavorando su innesti e chimere di *Solanum nigrum*, di fatto introdusse il termine di poliploidia (Ramsey & Schemske, 1998; Grant, 1981). Digby (1912) descrisse la presenza di un tipo fertile di *Primula kewensis* da un ibrido interspecifico sterile attraverso la duplicazione cromosomica, ma non realizzò il suo significato nel contesto più ampio dei fenomeni di

poliploidia (Stebbins, 1985). Sebbene non sapesse dell'ibrido fertile di *Primula*, Winge (1917), dai suoi studi sulle conte cromosomiche in *Chenopodium* e *Chrysanthemum*, scoprì che i numeri cromosomici di specie imparentate erano tutti multipli di un qualche numero base comune e successivamente propose l'ipotesi che la duplicazione cromosomica in ibridi interspecifici sterili fosse un mezzo per convertirli in prole fertile (Swanson *et al.*, 1981; Hieter & Griffith, 1999). Ciò fu poi verificato da vari studi condotti mediante ibridazioni artificiali interspecifiche in *Nicotiana*, *Raphanobrassica* e *Gaeleopsis* (Grant, 1981).

1.2.3.1 Origine dei poliploidi

Esistono diverse modalità per l'origine di poliploidi. Queste includono principalmente la duplicazione somatica durante la mitosi, come anche fenomeni di non disgiunzione in meiosi che conducono alla produzione di gameti a corredo non ridotto, polispermia (fecondazione di un singolo uovo da parte di due nuclei maschili) ed endoreplicazione (replicazione del DNA ma nessuna citocinesi). L'endoreduplicazione comunque, è più simile alla duplicazione somatica, per cui non è interpretata da alcuni autori come un meccanismo separato (Grant, 1981). La duplicazione cromosomica può verificarsi o al livello dello zigote per produrre un individuo completamente poliploide o localmente in alcuni meristemi apicali, dando luogo a chimere poliploidi. La poliploidia somatica è identificabile anche in alcuni tessuti vegetali non meristemati (cellule tetraploidi e ottoploidi nella corteccia e nel midollo di *Vicia faba*; Ramsey & Schemske, 1998). La causa principale della duplicazione somatica è la non disgiunzione mitotica (Grant, 1981). Questo fenomeno può avvenire in tessuti puramente vegetativi (come nei noduli radicali di alcune

leguminose), come in un ramo che può produrre fiori o in stadi embrionali precoci (essendo così trasmesso alle generazioni successive (Grant, 1981). La duplicazione spontanea di cromosomi somatici è un evento raro (Lewis, 1980) e l'unico esempio ben documentato è il caso della *Primula kewensis* tetraploide, che si generò dalla duplicazione somatica in alcuni rami in fioritura di un ibrido diploide.

Il fenomeno della duplicazione cromosomica negli zigoti è stato meglio descritto attraverso esperimenti di shock termico in cui giovani embrioni erano brevemente esposti ad alte temperature (Lewis, 1980). La duplicazione zigotica fu inizialmente proposta da Winge e la comparsa spontanea di tetraploidi in *Oenothera lamarckiana* e ibridi amplidiploidi in *Nicotiana* fu spiegata con la duplicazione cromosomica dello zigote (Lewis, 1980; Grant 1981). Una diversa importante modalità di formazione di un poliploide coinvolge la *non-riduzione* gametica o la *restituzione nucleare meiotica* durante la microsporogenesi e la megasporogenesi, che danno luogo a gameti $2n$ non ridotti. La non-riduzione può essere dovuta a non disgiunzione meiotica, errori nella formazione della parete cellulare o formazioni di gameti per mezzo di mitosi invece che meiosi. L'esempio classico, *Raphanobrassica*, si originò da un processo istantaneo di fusione di due gameti non ridotti (Elliot, 1958; Grant, 1981; Fig. 1.6). La produzione di gameti non ridotti è stato dimostrato essere molto comune in *Solanum spp* (Lewis, 1980). Ancora, la poliploidia può manifestarsi come effetto di non-riduzione in una delle linee germinali (pollini e ovuli). In questo caso un individuo tetraploide può risultare da un processo in due fasi (talvolta indicato come meccanismo *triploid bridge*) dalla fusione di un gamete non ridotto $2n$ con un gamete ridotto $1n$, per produrre uno zigote $3n$ seguito dalla successiva fusione di un gamete $3n$ con un normale gamete $1n$ nella generazione successiva che infine produce un individuo tetraploide (come nell'artificiale *Galeopsis tetrahit*; Grant; 1981). Questo meccanismo di formazione di un poliploide da gameti non ridotti è più comune del primo (Lewis, 1980; Ramsey & Schemske, 1998) (sebbene diversi autori siano ancora critici sulla sua

efficacia per via della frequente sterilità della maggior parte degli ibridi triploidi; Lewis, 1980). La produzione di gameti non ridotti è anche funzione dell'ambiente e del genotipo. Ad esempio, è stato dimostrato che avverse condizioni di crescita favoriscano un incremento nel numero di gameti non ridotti in *Gilia*. Un caso dell'influenza del genotipo nella modulazione della produzione di gameti non ridotti può essere identificato nel mais, dove il gene *elongate* sul cromosoma 3 incrementa a proporzione di uova diploidi prodotte (Lewis, 1980; Grant, 1981).

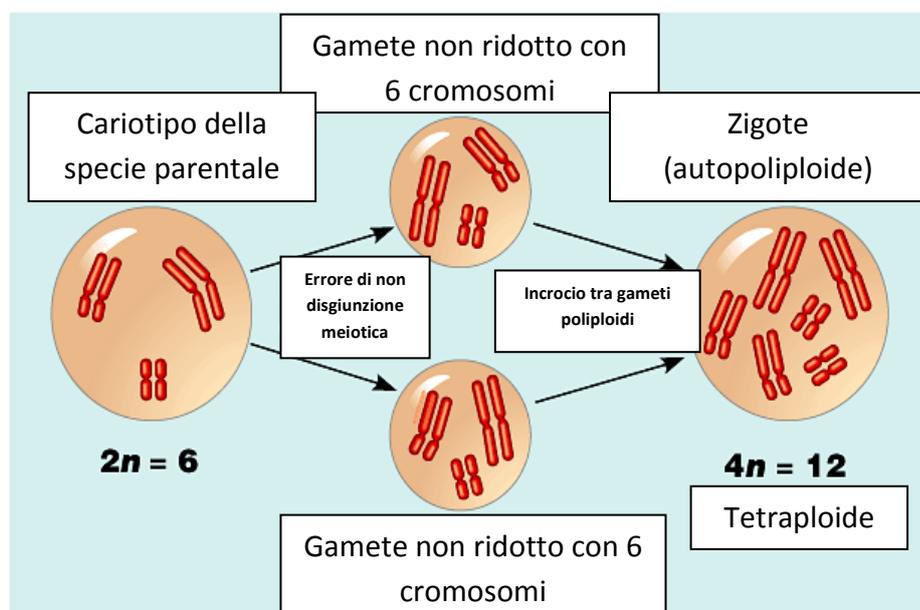


Figura 1.6. Generazione di un corredo cromosomico tetraploide a partire da corredi diploidi normali. La non disgiunzione meiotica produce gameti diploidi che per fusione generano uno zigote tetraploide.

1.2.3.2 Vari fattori che promuovono la poliploidia

Esiste un gran numero di altri fattori che favoriscono la poliploidia, inclusi le modalità di riproduzione, le modalità di fecondazione, il sistema di accoppiamento, lo

sviluppo del portamento della piante, le dimensioni dei cromosomi, e molte altre. La poliploidia sembra essere favorita in piante perenni o comunque di lunga durata che posseggono vari mezzi di propagazione (*Fragia, Rubus, Artemisia, Potamogeton* etc.) ed in quelle con alta frequenza di ibridazione intraspecifica naturale (Hieter & Griffith, 1999). Diverse spiegazioni sono state proposte da studi distinti (Lewis, 1980; Grant, 1981; Stebbins, 1950) per questo fenomeno; uno tra i più condivisi è l'aumento di opportunità che la duplicazione somatica ha reso possibile nelle piante a vita lunga e con mezzi di riproduzione vegetativa (Grant, 1981). La fecondazione incrociata e l'allogamia si ritenevano fattori che promuovono la poliploidia, mentre l'autogamia si credeva fosse responsabile di una sua limitazione (Stebbins, 1950). Ma la questione non sembra ancora chiarita, se nella tribù *Midinae* (Compositae) la poliploidia si evidenzia altamente diffusa nel genere autogamo *Madia* e pressoché assente nelle specie allogame *Layia* e *Hemizonia* (Stebbins, 1950). Rispetto invece a parametri geografici, si è scoperto che la proporzione di poliploidi incrementa con l'aumentare di latitudine e di altitudine, sebbene la correlazione con quest'ultima appaia meno solida (Hieter & Griffith, 1999). Diverse ragioni sono state avanzate per spiegare questa tendenza nella distribuzione dei poliploidi, come la migliore adattabilità dei poliploidi a climi più rigidi e ai cambiamenti climatici ciclici del Pleistocene. Diversi fattori ecologici sembrano inoltre coinvolti nella distribuzione dei poliploidi, rinvenuti più di frequente su suoli umidi e in praterie rispetto ad habitat più stabili con suoli più aridi e comunità forestali (Grant, 1981). Rispetto al sistema riproduttivo, il meccanismo principale dell'origine degli allopoliploidi nelle piante annuali è la fusione di gameti non ridotti, e la presenza di un sistema di accoppiamento in *outcrossing* tende a ridurre le occasioni di incontro tra gameti non ridotti (Grant, 1981).

Un portamento a crescita perenne tende a favorire la poliploidia rispetto a quanto accada per le piante annuali, probabilmente per il fatto che una lunga durata del ciclo vitale aumenta la possibilità di eventi rari, come la poliploidizzazione che segue

un'ibridazione, e permette incrocio dell'individuo poliploide con la sua prole (Grant, 1981; Otto & Whitton, 2000). Una relazione reciproca è stata osservata tra dimensioni cellulari, dimensioni cromosomiche e numero di cromosomi nei poliploidi (Grant, 1981), che si sommano a fattori precedentemente menzionati come il genotipo e l'ambiente.

1.2.3.3 Classificazione dei poliploidi

Kihara e Ono (1926) hanno descritto per primi due tipi distinti di poliploidi: *autopoliploidi* e *alloploidi* (Fig. 1.7). L'autopoliploidia consiste nella duplicazione dello stesso set cromosomico, mentre l'alloploidia è il prodotto di un'ibridazione interspecifica. È in effetti il prodotto della duplicazione in una specie ibrida ed è perciò un poliploide che contiene set separati di cromosomi non omologhi. La frequenza di formazioni multivalente al momento della sinapsi cromosomica è stato inizialmente evidenziato come criterio di distinzione tra auto- ed alloploidia (Stebbins, 1947). Successivamente sono stati proposti altri mezzi di discriminazione, ma la classificazione di una pianta come auto- o allotetraploide semplicemente sulla base di somiglianze morfologiche con taluni diploidi, o del comportamento dei cromosomi alla meiosi sono da ritenersi di scarso valore pratico.

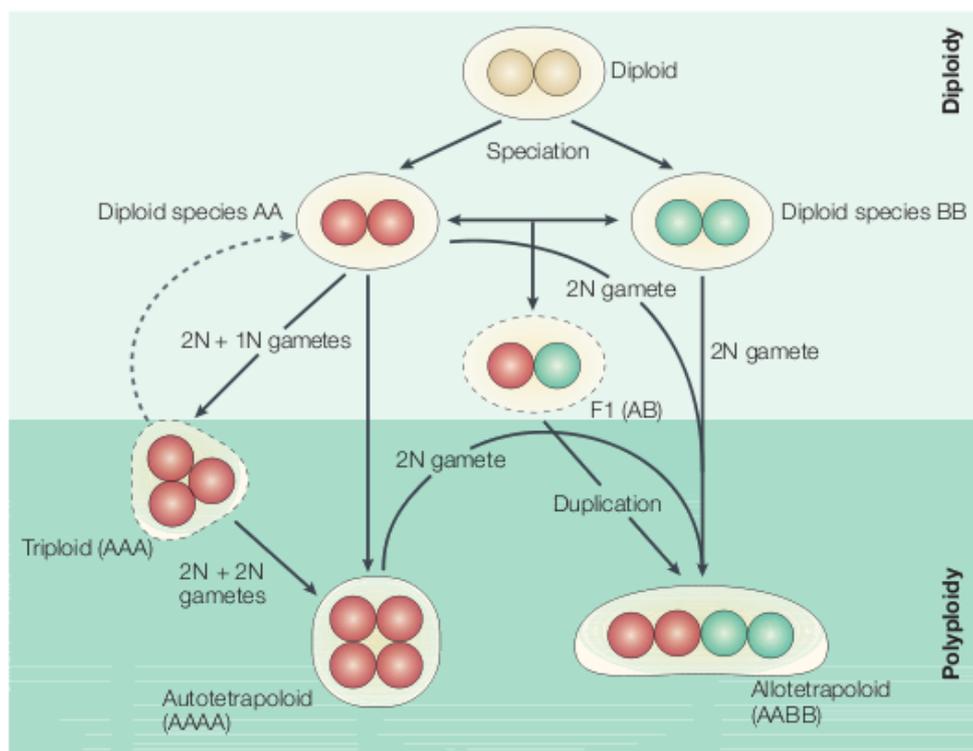


Figura 1.7. Diagramma dei meccanismi di poliploidizzazione che danno luogo ad autopoliploidi ed allopoliploidi.

Classificazioni più estensive sono state via via proposte in altri contributi scientifici più recenti fino ad oggi (Wolfe, 2001). Segue una lista delle diverse classi di poliploidi comunemente accettata:

Autopoliploidi: In questo caso le due copie genomiche sono identiche, ma possono aversi casi di *autopoliploidia vera o stretta* o di una *autopoliploidia interrazziale*, nel caso rispettivamente che le coppie di cromosomi omologhi contengano cromatidi tutti fratelli (AAAA) o due coppie di cromosomi omologhi di origini diverse (AA \times AA). Gli autopoliploidi sono anche indicati come *poliploidi polisomici* e possono ritrovarsi a livello di triploidia come anche a livelli di ploidia maggiore (Grant, 1981).

Anfiploidi: Questo termine, coniato da Clausen, Keck e Hiesey (1945), include i veri allopoliploidi, i poliploidi segmentali, gli autoallopoliploidi e gli aneuploidi.

Un vero allopoliploide, cosiddetto *poliploide disomico*, è una specie poliploide derivata dall'ibridazione di parentali che hanno una dissimilarità tra i loro genomi, e ciò può accadere ad ogni livello dalla tetraploidia in su. Ad esempio: $AA \times BB \rightarrow AABB$.

In un allopoliploide segmentale, i genomi nelle specie sono parzialmente omologhi tra loro e perciò esibiscono una formazione parziale di multivalenti. Ad esempio: $A_1A_1 \times A_2A_2 \rightarrow A_1A_1A_2A_2$. Gli autoallopoliploidi invece sono poliploidi che combinano le caratteristiche degli autoploidi e degli allopoliploidi, come in $AA \times BBBB \rightarrow AABBBB$, mentre gli aneuploidi mostrano perdita o guadagno di un singolo cromosoma.

Paleopoliploide: Questo è il caso di un antico poliploide che in epoche successive è divenuto nuovamente diploide a causa di divergenza di sequenza tra cromosomi duplicati, come è noto per il genoma umano (Hilu, 1993; Wolfe, 2001).

Neopoliploidi: Sono definiti così i gruppi di individui poliploidi originati da eventi di poliploidizzazione recenti, che comprendono sia casi di autoploidia che di allopoliploidia (Lewis, 1980; Ramsey & Schemske, 2002).

Un'unità tassonomica poliploide può comprendere individui con una serie di livelli di ploidia all'interno della stessa specie o popolazione, dando luogo alle cosiddette *serie di poliploidi*. Queste possono consistere di individui con numeri cromosomici multipli maggiori di un certo livello di ploidia base, o anche minori di esso. Basti citare ad esempio *Chrysanthemum* ($n=9$) che si mostra nella serie poliploide corredi 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, o al contrario in *Crepis occidentalis*, con $n=11$, la cui serie

mostra forme con corredi $2x$, $3x$, $4x$, $5x$, $7x$ e $8x$ (Grant, 1981). La serie aneuploide rappresenta una successione di allopoliploidi basata su differenti numeri cromosomici base. I poliploidi dibasici sono la somma di differenti numeri diploidi, come in *Brassica aleracea* ($2n=18$) e *Brassica campestris* ($2n=20$) e nel loro tetraploide derivato *B. napus* ($2n=4x=38$) (Grant, 1981). I poliploidi spesso sono in grado di tollerare la perdita di uno o più coppie cromosomiche che possono nel tempo dare luogo a serie poliploidi modificate, come in *Hesperis* in cui specie diverse hanno numeri gametici di $n = 7, 14, 13$ e 12 (Grant, 1981).

1.2.3.4 Conseguenze ed implicazioni della poliploidia

La poliploidia e l'evoluzione di nuove specie

La poliploidia è stata considerata l'agente più importante per l'evoluzione e la speciazione (Schultz, 1980; Soltis & Soltis, 1995). Si stima che tra il 47% ed il 70% delle angiosperme sia poliploide (Ramsey & Schemske, 1998) e la percentuale arriva addirittura al 95% nelle *Pteridophyta* (Leitch & Bennett, 1997; Ramsey & Schemske, 1998). La poliploidia è piuttosto comune in alcune famiglie come *Rubiaceae*, *Compositae*, *Iridaceae*, *Gramineae* e molte altre; mentre più rara, ma mai assente in altre famiglie come *Caesalpinaceae*, *Passifloraceae* e *Fagaceae* (Grant, 1981). Nelle Pteridofite omospore i numeri di base dei cromosomi sono risultati più elevati rispetto ai tipi eterosporei (Lewis, 1980). Inoltre le percentuali più elevate si riscontrano in specie erbacee perenni e le più basse in quelle annuali ed in quelle arboree (Stebbins, 1950, 1971). Sebbene rari nelle Tallofite (*Algae*), poliploidi sono stati osservati in *Cladophora* e *Chara* (Stebbins, 1950); pochi casi nelle Rodoficofite e nelle Feoficofite. I

muschi briofiti sembrano offrire un chiaro esempio della comparsa di poliploidi naturali e artificiali (Stebbins, 1950), ma essi sembrano piuttosto infrequenti nelle Epatiche (Grant, 1981). Stebbins (1950) ha anche focalizzato l'attenzione sulle differenze intergeneriche nella frequenza di poliploidi, citando l'esempio delle *Saliaceae*, in cui la poliploidia è comune in *Salix*, ma rara in *Populus*. Nelle Gimnosperme è piuttosto rara, sconosciuta nelle Cicadee e in *Ginko*, ma nota in *Ephedra* (Grant, 1981), *Pseudolarix amabilis* (Stebbins, 1950) e *Sequoia sempervirens* (Stebbins, 1950). A dispetto della prevalenza di alti tassi di poliploidia in molte specie di piante ci sono visioni contrastanti sul contributo relativo della poliploidia nei processi di speciazione (Otto & Whitton, 2000). Infatti, se secondo Stebbins (1971) la poliploidia ha contribuito poco all'evoluzione progressiva, Schultz, nel 1980, afferma che essa, ben lontana da ruoli secondari nell'evoluzione, ha fornito loci genici addizionali e neutrali alla selezione, indispensabili per le fasi principali nell'evoluzione degli animali.

Questa controversia dura ormai da più di 50 anni, ma le nuove tecniche di analisi molecolari stanno contribuendo a ridefinire molti dei tradizionali paradigmi sulla poliploidia. Le forze evolutive coinvolte nella speciazione possono genericamente essere raggruppare in quelle che producono una variazione e quelle che tendono a fissarla nella popolazione. Le prime includono ibridazione e nuove mutazioni, mentre le ultime includono la selezione in ambiti di ampio *outcrossing*, inincrocio per autofecondazione e selezione o per accoppiamento assortativo (Grant, 1981). Le forze che producono variazione e quelle che la fissano possono combinarsi in vario modo. Così il processo di poliploidizzazione può essenzialmente essere considerato una forza che genera la variazione, coinvolgendo estese ibridazioni intra ed inter-specifiche (Lewis, 1980). Data l'esistenza di ibridi interspecifici naturali, è presumibile che F_1 così caratterizzate compaiano in tutti i maggiori gruppi tassonomici vegetali (Grant, 1980). Esempi di poliploidi artificiali noti vanno dal classico caso di *Raphanobrassica* di

Karpechenko a molte delle moderne cultivar (Swanson *et al.*, 1981). Così il contributo della poliploidia alla speciazione può essere illustrato prendendo in esame alcuni specifici esempi.

Il classico incrocio intergenerico tra *Raphanus* (Ravanello, $2n=18$) e *Brassica* (Cavolo, $2n=18$) ha prodotto la formazione di una F_1 ibrida sterile con soli cromosomi univalenti. Una successiva duplicazione cromosomica ha dato luogo ad un allotetraploide fertile, *Raphanobrassica* ($2n=36$), che risulta simile ai normali diploidi, fornendo così un esempio chiaro di come l'ibridazione tra due specie, seguita da duplicazione cromosomica possa *cataclismaticamente* (evoluzione cataclismatica) condurre alla creazione di nuove specie (Swanson *et al.*, 1981). E sebbene sia una specie poliploide creata artificialmente, questo caso stabilisce tutti i criteri richiesti per la definizione di specie naturale (Swanson *et al.*, 1981). La *Primula kewensis* ha rappresentato un altro esempio di un allotetraploide artificiale creato da un ibrido sterile, derivato da due specie diploidi. Il contributo delle poliploidia naturale alla creazione di nuove specie può essere identificato meglio nelle storie di varie specie coltivate come il grano (*Triticum aestivo*), il tabacco (*Nicotiana tabaccum*), e il cotone degli altipiani (*Gossypium hirsutum*) per citarne alcuni (Swanson *et al.*, 1981). Il grano alloesaploide (*Triticum aestivum*) è comparso da tre specie erbacee diploidi accoppiate con duplicazione cromosomica (Fig. 1.8).

Il cotone del Nuovo Mondo ($2n=52$) si suppone sia generato da un evento di allopoliploidizzazione tra i cotone asiatici ($2n=26$) e quelli americani ($2n=26$; Elliot, 1958). In modo analogo molte specie di mostarda come *Brassica juncea* ($2n=36$) e *B. napus* ($2n=38$) si suppone derivino da incroci inter-specifici rispettivamente tra *B. nigra* ($2n=16$) e *B. campestris* ($2n=20$) e tra *B. oleacea* ($2n=18$) e *B. campestris* ($2n=20$) (Elliot, 1958). E' importante a questo punto della trattazione passare in esame brevemente alcuni punti di vista tradizionali sulla poliploidia e la ridefinizione di alcuni di questi in base alle recenti evidenze molecolari.

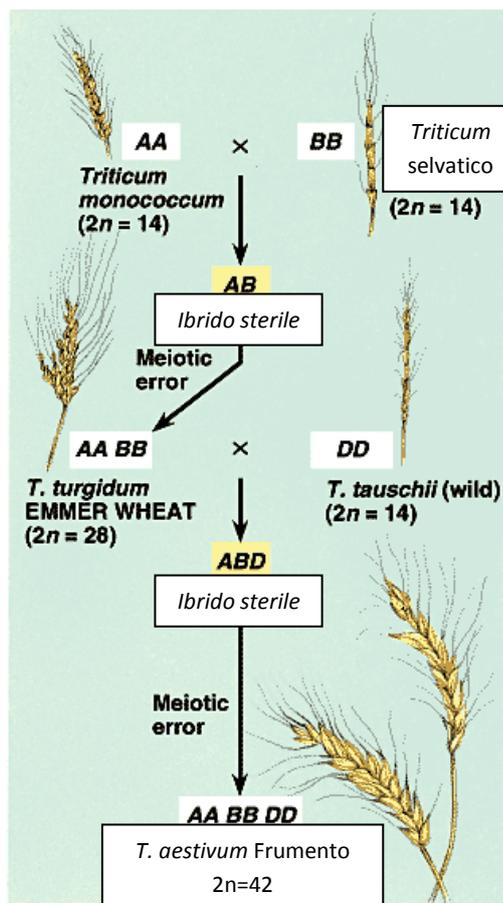


Figura 1.8. Sviluppo della specie esaploide *Triticum aestivum* per poliploidia post ibridazione.

A lungo gli eventi di poliploidizzazione sono stati considerati rari e si riteneva che la maggior parte delle specie poliploidi avessero una singola origine (Soltis & Soltis, 1995). In generale si riteneva che i poliploidi avessero la capacità di colonizzare un *range* di habitat più ampio e di sopravvivere meglio a climi rigidi e variabili rispetto ai loro progenitori diploidi, probabilmente grazie all'aumentata eterozigotità e flessibilità genica e biochimica, fornita dalla presenza di alleli addizionali (Stebbins, 1985; Song *et al.*, 1995; Matzke *et al.*, 2000). Grazie all'*effetto tamponante* di genomi multipli, si riteneva che mutazioni e ricombinazione influenzassero lo sviluppo di nuovi complessi adattativi nei poliploidi meno che nei diploidi (assumendo tassi mutazionali uguali) (Song *et al.*, 1995; Soltis & Soltis, 1999). Per motivi analoghi, gli allopoliploidi erano considerati una forza dominante nell'evoluzione, mentre gli autopoliploidi d'altro canto

erano considerati rari e scarsamente adattabili (Soltis & Soltis, 1999). Recentemente però, tecniche molecolari come RFLP, GISH, colorazioni cromosomiche, stanno ridisegnando questi paradigmi. Più recentemente infatti si è ritenuto che i poliploidi rappresentino una classe di mutazione frequente, che occasionalmente si stabilizza all'interno delle popolazioni quando i suoi effetti fenotipici siano relativamente di scarsa entità (Otto & Whitton, 2000). O anche, al contrario, che la poliploidia possa essere un evento comune poiché specie poliploidi possono evolvere più velocemente o in direzioni inattese (Ramsey & Schemske, 2002). Molte delle specie poliploidi vengono oggi considerate provenienti da origini multiple con poche eccezioni come *Arachis hypogea* e *Spartina anglica*. Non è noto quanto siano comuni le origini multiple dei poliploidi, ma nella maggior parte dei casi si pensa che la loro diffusione sia sottostimata (Soltis & Soltis, 1999).

Studi sull'alloploidia recente in *Tragopogon* indicano che eventi di origini multiple possano verificarsi frequentemente su scale temporali e spaziali anche molto ridotte (anche solo 50 anni in una piccola regione a est di Washington; Soltis & Soltis, 1995). Il concetto di poliploidizzazione ricorrente e successiva ulteriore ibridazione dei genotipi è più evidente nella flora artica. Numerosi eventi di poliploidia in popolazioni diploidi differenziate geneticamente e morfologicamente ha prodotto un complesso di genotipi differenti in termini di ploidia, e questi genotipi a loro volta finiscono col venire a contatto reciproco e ibridizzano (Soltis & Soltis, 1999). Un'altra scoperta recente è quella dell'occorrenza di estensive riorganizzazioni genomiche nei poliploidi. Colorazioni cromosomiche, mappature genetiche, e genetica comparativa hanno mostrato riorganizzazioni intra- e intergenomiche estese. Nove traslocazioni intergenomiche sono state individuate nell'allotetraploide del tabacco (*Nicotiana*). Anche la soia paleotetraploide ha rivelato un significativo riarrangiamento intracromosomico (Soltis & Soltis, 1999). In un altro esperimento condotto da Song e collaboratori nel 1995, che ha usato poliploidi sintetici di *Brassica* per studiare

l'evoluzione delle prime generazioni dopo la poliploidizzazione, è stato evidenziato che nella F_5 si erano verificati estensivi cambiamenti genomici rispetto alla F_2 , indicati dalla perdita o acquisizione di frammenti di restrizione parentali ed anche dalla comparsa di frammenti nuovi. Gli elementi trasponibili (TE) possono inoltre facilitare la ristrutturazione del genoma dei poliploidi poichè le copie multiple di tutti i geni possono tamponare le conseguenze deleterie della trasposizione e i TE tenderanno a moltiplicarsi e ad essere mantenuti (Matzke & Matzke, 1998): nel cotone ad esempio, la diffusione nel genoma D di ripetizioni del genoma A si crede sia imputabile principalmente alla trasposizione genica (Matzke *et al.*, 2000). In aggiunta alla ristrutturazione genica, in un organismo poliploide potrebbero realizzarsi destini diversi per i geni ridondanti, inclusa la divergenza regolatoria e funzionale, che conserva il numero di geni aumentato ma può anche condurre ad un *silenziamento genico dipendente dal numero di copie*, ovvero un cambiamento epigenetico (Matzke *et al.*, 2000; Soltis & Soltis, 1999). Un silenziamento estensivo può in fine produrre un poliploide che non appare più strutturato come un allopoliploide, ad esempio in *Zea mays*. Inoltre il silenziamento genico per modificazioni epigenetiche si pensa sia reversibile (Matzke *et al.*, 2000). Riguardo alla capacità presunta delle specie poliploidi di colonizzare habitat più variegati, un punto di vista critico (Stebbins, 1985) ipotizza che il miglioramento deriverebbe da contatti secondari tra popolazioni prima isolate, che genererebbero combinazioni di geni più aggressive ed efficienti in termini adattativi. Infatti un esperimento durato 39 anni sui diploidi e tetraploidi di *Ehrharta erecta*, ha dimostrato che in condizioni naturali il comportamento del poliploidie era meno efficace di quello dell'ancestore diploide. L'alto tasso di frequenza di poliploidi è stata esaminata e spiegata su piani diversi. Combinazioni incompatibili di geni o cromosomi prodotti dalla condizione di allopoliploidia non possono essere facilmente espulse dalla segregazione mendeliana e l'eliminazione di queste sequenze DNA e l'alterazione di *pattern* di metilazione del DNA permette il ripristino della fertilità in

alcuni poliploidi (Rieseberg, 2001). Un'altra visione contraddittoria nel contesto della poliploidia rispetto all'evoluzione è il fatto che gli autoploiploidi non siano svantaggiati sul piano adattativo. Infatti importanti attributi genetici, come l'aumento di molteplicità enzimatica e l'aumento di diversità allelica, di fatto forniscono soluzioni di grande successo adattativo in natura (Soltis & Soltis , 1999).

Altre conseguenze della poliploidia

Oltre agli aspetti adattativi ed evolutivi, la poliploidia ha implicazioni profonde anche su vari altri fronti:

Citologia: I poliploidi tendono ad avere cellule mediamente più grandi dei loro progenitori, ma la variazione del volume cellulare sembra un dato controverso che non trova riscontri costanti (Levin, 1983). Mediamente sembra ci sia una modificazione del rapporto superficie/volume cellulare, determinato dalla dipendenza di enzimi legati alla superficie o al volume (ornitina transcarbamilasi, triptofano sintasi, invertasi, e fosfatasi acida (Lewis, 1980; Levin, 1983). Nei poliploidi, metabolismo e crescita sembrano essere generalmente ritardati rispetto ai diploidi a causa della modificazione nelle relazioni geometriche tra il nucleo ed il resto della cellula. Nei poliploidi è stata inoltre accertata una relazione inversa tra contenuto di DNA e tasso di sviluppo come anche un ridotto numero di divisioni cellulari durante lo sviluppo (Lewis, 1980).

Attività genica: Ci sono risultati variabili anche in merito all'effetto della poliploidia sull'attività genica, sui contenuti totali di RNA e proteine (Osborn *et al.*,

2003). L'amplificazione differenziale di cistroni di RNA è stata correlata all'aumento di livelli di ploidia in *Datura innoxia* e nel pomodoro autotetraploide (Lewis, 1980). In relazione all'effetto del raddoppiamento cromosomico sul funzionamento degli enzimi, esistono risultati ambigui. I livelli di vari enzimi coinvolti nella catena di trasporto degli elettroni, nella fotosintesi e nella foto respirazione sembrano aumentare, diminuire o restare invariati nel tetraploide del pomodoro (Lewis, 1980). Il tasso di scambio di anidride carbonica sembra in genere ridursi con l'aumento di livello di ploidia, ma è stato trovato invece in incremento in *Festuca arundinacea*. Gli effetti del raddoppiamento cromosomico può esibire differenze tra gametofito e sporofito della stessa specie ed anche tra differenti razze della stessa specie (Levin, 2002).

Sostanze coinvolte nella crescita: La poliploidia sembra ridurre i livelli di acido abscissico e auxina nell'autotetraploide *Lycopersicon pimpinellifolium* rispetto ai diploidi parentali (Lewis, 1980).

Bilancio idrico: Sia in pomodori autotetraploidi che in *Petunia* (Stebbins, 1950) sono stati identificati contenuti idrici maggiori e minore pressione osmotica. Sebbene non si abbiano dati certi sui tassi di assorbimento dell'acqua, quelli di traspirazione sembrano sostanzialmente minori nei poliploidi.

Risposte a stress differenti: Molti parametri, come il peso complessivo della pianta, il contenuto relativo di acqua ed altri, mostrano livelli minori nei poliploidi rispetto ai diploidi (Lewis, 1980). I poliploidi sembrano essere in genere più tolleranti alla siccità dei loro progenitori diploidi (Levin, 1983). Stebbins (1985) ha però osservato che i tetraploidi di *Ehnharta erecta* sopravvivevano soltanto su suoli ombreggiati e ben drenati, mentre il diploide sopravviveva in condizioni edafiche più difficili. La tolleranza al freddo negli autotetraploidi *Brassica campestris*, *Raphanus sativus*, e pochi altri è sembrata migliore dei diploidi, ma il contrario è stato riscontrato in

tetraploidi di *Trifolium repens* (Levin, 1983). Inoltre le piante poliploidi si sono dimostrate più resistenti a mutagenesi e irradiazione, più adatte suoli poveri per via della crescita generalmente rallentata ed alla conseguente minore richiesta di nutrienti (Levin, 1983). Sembrano inoltre più resistenti a patogeni e parassiti grazie all'incremento della produzione di vari metaboliti secondari, e mostrano maggiore tolleranza agli erbicidi, probabilmente per l'aumentata eterozigosità e l'incremento di ridondanza genetica (Levin, 1983).

1.3 Caratteristiche della famiglia delle Orchidee

Il bacino del Mediterraneo rappresenta un interessante hot spot di biodiversità globale (Médail & Quézel, 2001; Thompson, 2005). Quest'area, caratterizzata da ambienti molto eterogenei e differenziati fra loro conserva una ricchezza di specie con un alto valore di endemismo, soprattutto nelle isole maggiori come la Sicilia e la Sardegna e rappresenta un' interessante area di studio per l'evoluzione e la distribuzione delle piante. Tra le angiosperme del mediterraneo, una particolare diversità di forme si è evoluta nella famiglia delle orchidee. All'interno dei membri mediterranei di questa famiglia si sono infatti evolute diverse e peculiari strategie riproduttive ed adattative che hanno portato all'origine di numerose specie ed ecotipi. In particolare, l'elevato tasso di frammentazione geografica ha portato, anche in questa famiglia, all'evoluzione di numerosi endemismi offrendo l'opportunità di utilizzare questo gruppo di piante a fiore come modello per lo studio di fenomeni evolutivi come la dispersione, la colonizzazione e la speciazione.

Si ritiene che la principale regione di origine, differenziamento e diffusione della famiglia delle *Orchidaceae* sia localizzato nelle regioni tropicali, sebbene non siano le uniche ad ospitarle. Infatti le *Orchidaceae*, sono distribuite con numerosi *taxa* su tutta la superficie del globo, fatta eccezione dei deserti, colonizzando gli habitat più diversi: dall'equatore alle regioni artiche, dal livello del mare fino a quote elevate. Il numero di specie registrato è in costante cambiamento a seguito di nuove scoperte e riorganizzazioni tassonomiche che arricchiscono ogni anno la conoscenza di queste piante. Infatti, con oltre 20.000 specie e 800 generi, le *Orchidaceae* competono con le *Asteraceae* per il primato della più numerosa tra le famiglie vegetali, costituendo circa un sesto della flora vascolare mondiale. Il maggior numero di specie è concentrato nelle aree tropicali e subtropicali di Asia, Australia, Africa e America, mentre Europa e

regione mediterranea ne ospitano circa 400. Di queste ultime oltre 160 possono essere rinvenute in Italia.

1.3.1 Caratteri morfologici

Le orchidee sono piante erbacee con parte ipogea perenne, da cui si sviluppa una rosetta fogliare all'inizio dell'inverno e poi, in primavera, uno scapo florale che produrrà all'estremità i fiori a formare un'infiorescenza. Sono piante perenni, divise tra terrestri, come quelle europee, oppure epifite, come nella quasi totalità delle specie esotiche; in questo caso la pianta vive tra i rami degli alberi, dove vi sono ideali condizioni alla sopravvivenza e alla riproduzione come umidità, irraggiamento luminoso, animali pronubi, etc. Alcune specie inoltre, presentano adattamenti saprofitici ad ambienti bui: non producono clorofilla ed estraggono risorse energetiche da specifici funghi microscopici, capaci di demolire le sostanze organiche dell'humus per produrne il nutrimento necessario alla pianta.

1.3.2 Apparato radicale

Le orchidee distribuite in Europa, presentano prevalentemente apparati sotterranei costituiti bulbo-tuberi o rizotuberi, di forma e dimensione variabili, che si rinnovano ad ogni nuova fase vegetativa; essi hanno funzione di riserva e di moltiplicazione vegetativa, mentre l'effettiva attività assorbente viene svolta da radici vere o avventizie che si sviluppano al di sopra di essi. I bulbo-tuberi appaiono generalmente interi, ovati o tondeggianti, sessili o pedunculati nei generi *Ophrys*, *Orchis* e *Serapias*; si mostrano invece variamente divisi in *Dactylorhiza*; oppure di forma oblunga e dotati di radici avventizie filamentose in *Cypripedium*, *Listera* ed

Epipactis; con radici fascicolate, frequentemente di notevole calibro, in *Neottia* e *Cephalanthera*; napiformi in *Platanthera* e *Spiranthes*; coralliformi in *Corallorhiza*; a volte come in *Goodyera* organizzati in apparato stolonifero o tunicati come nei generi *Malaxis* e *Hammarbia*. Nella maggior parte dei casi, i rizotuberi sono generalmente due. Ciò permette ad uno di essi, ricco di sostanze di riserva accumulate durante la stagione vegetativa precedente, di fornire gran parte delle sostanze nutritive che la pianta utilizza durante lo sviluppo vegetativo, la fase di fioritura e quella di fruttificazione. Al termine della stagione riproduttiva questo rizotubero avrà esaurito la propria riserva, avvizzendo. Parallelamente, il secondo rizotubero ha acquisito volume e sostanze di riserva sintetizzate con la fotosintesi, che verranno utilizzate per lo sviluppo vegetativo dell'anno successivo.

1.3.3 Le foglie e lo stelo

Nelle orchidee temperate, il fusto, detto anche scapo o caule, prodotto nella fase di germogliazione del bulbo-tubero, diviene la parte più evidente della pianta. Da esso dipartono foglie e fiori. La struttura, eretta, non è ramificata e può essere esile o robusta, come anche a sezione cilindrica o squadrata. Normalmente si presenta glabro, ma in alcuni casi anche pubescente o glanduloso. Il colore solitamente verde, presenta talvolta sfumature rossastre, violacee o brune.

Le caratteristiche edafiche del sito che ospita la pianta e l'età della pianta stessa ne determinano le dimensioni, che quindi possono variare sensibilmente anche all'interno della stessa specie. Lo scapo permane per la durata di un solo ciclo vegetativo annuale, disseccandosi al termine della fruttificazione. Esso verrà quindi nuovamente generato dal bulbo-tubero dopo lo svernamento, all'inizio della nuova fase vegetativa. L'infiorescenza che si produce all'apice dello scapo ha portamento

monopodiale spiciforme ed è composta da fiori in numero variabile, con antesi acropeta, che determina l'aspetto di piramide, più o meno evidente nella fase intermedia del periodo di fioritura.

Generalmente, una rosetta basale riunisce tutte le foglie alla base dello scapo, ma rade *foglie cauline* possono presentarsi anche lungo il fusto in molte specie. Lungo lo scapo verso il suo apice, la lamina fogliare si riduce progressivamente fino allo stato di *brattea florale*. La foglia è generalmente semplice, con margine intero, parallelinervia nella maggior parte delle specie. La lamina fogliare si presenta di solito lineare, tendendo talvolta a conformazioni variamente ovate, lanceolate, oblunghe o ellittiche. Nei casi di adattamenti agli ambienti bui, le orchidee prive di clorofilla instaurano una *simbiosi micorrizica*. Non mostrando parti verdi, appaiono apparentemente prive di foglie, ridotte allo stato di piccole squame lungo la lunghezza del caule.

1.3.4 Il fiore

A differenza delle orchidee tropicali, dotate di fiori grandi e profumati in numero più o meno variabile, le orchidee terrestri delle regioni temperate producono fiori piccoli all'apice dello scapo in un'infiorescenza più o meno fitta. Il singolo fiore è prodotto da una gemma presente tra lo scapo e una brattea. La struttura del fiore di un'orchidea raccoglie nella sua morfologia i principali adattamenti all'impollinazione da parte di insetti pronubi.

Come usuale per le *Liliaceae*, nel fiore delle orchidee non è possibile distinguere il calice (verticillo di sepali) dalla corolla (verticillo di petali) per cui i pezzi floreali vengono complessivamente indicati come *tepali*. La struttura floreale di base è composta da due verticilli trimeri: il più esterno (di tepali esterni) è composto da tre

pezzi petaloidi corrispondenti ai sepali; due di questi sono posti in posizione laterale esterna (sepali esterni), mentre il terzo superiormente (sepalo mediano o superiore); il verticillo interno dispone i tre pezzi florali intercalati ai tre pezzi del verticillo esterno: i due petali laterali sono spesso ridotti, mentre il terzo, in posizione infero-mediana, con dimensioni marcatamente maggiori, detto *labello*, mostra forme molto variabili e svolge funzione vessillare. Infatti è proprio a carico del labello che si ritrova la maggior parte degli adattamenti alle simbiosi specie-specifiche con gli insetti impollinatori.

La *resupinazione* caratterizza l'ontogenesi del fiore: prima dell'antesi, i verticilli florali, compiono un movimento di rotazione di circa 180° a carico dell'ovario e/o del peduncolo. Si produce così l'inversione delle posizioni relative tra labello e sepalo mediano. E il labello viene a trovarsi nella posizione più adatta all'attrazione e all'orientamento per l'atterraggio degli insetti impollinatori. Il labello, per l'elevata specificità con l'insetto pronubo, diverge molto in termini morfologici tra specie, sottospecie e talvolta anche tra popolazioni diverse della medesima specie. Può infatti essere intero, o settato in lobi (talvolta essi stessi divisi in lobuli); può mostrare una strozzatura trasversale che distingue una regione prossimale superiore, detta *epichilo*, da una inferiore, detta *ipochilo*. Il labello può presentare delle callosità di varie forme e dimensioni alla sua base, e talvolta esprime all'apice del lobo mediano un'appendice di lunghezza variabile detta *apicolo*. Espressione di adattamenti estremamente specifici e localizzati nei meccanismi riproduttivi delle *Orchidaceae*, è la presenza sulla lamina superiore del labello di disegni di vario tipo e colore che simulano pattern cromatici necessari per l'attrazione degli impollinatori. Nel caso delle *Ophrys*, in cui il fenomeno raggiunge manifestazioni estreme, tale disegno prende il nome di *specchio*, mentre per il genere *Orchis* sono tipici aspetto e consistenza papilloso che li differenziano marcatamente dal primo gruppo. Molto spesso, la base del labello presenta lo *sperone* o *sprone*: formazione sacciforme appendicolare, variamente differenziata tra specie

diverse, che è generalmente indicata col nome di *sperone* o *sprone*, con funzione di *nettario*.

I fiori delle orchidee sono tipicamente ermafroditi. *Androceo* e *gineceo* sono fusi tra loro in posizione centrale a formare una struttura detta *ginandrio* o *ginostemio*, connessa all'ovario al di sopra del labello. Due dei tre stami tipici delle *Liliaceae* sono ridotti ad abbozzi detti *punti staminodali* o *staminodi*, mentre l'unico stame funzionale in posizione centrale porta un'antera dotata di due sacchi pollinici affiancati. I granuli pollinici sono addensati in due compatte formazioni apicali claviformi, dette *pollinodii* o *pollinii*. Essi sono dotati di un peduncolo che prende il nome di *caudicola*, o *codetta*, con cui sono alloggiate all'interno del *rostello*. Questa è una tasca membranosa che espone delle strutture ghiandolari dette *viscidii*. I viscidii hanno funzione adesiva e consentono l'adesione dei pollinodi a specifiche parti del corpo dell'insetto attratto, che abbandona il fiore portando con sé l'intero carico pollinico.

L'ovario è infero, tricarpellare, e generalmente uniloculare, con tre placente parietali doppiamente striate. Esso si sviluppa tra l'asse del caule e la base del fiore, dove termina in uno *stigma* modificato, posizionato alla base dell'antera. Con la fecondazione, i tre carpelli saldati tra loro si sviluppano in una capsula deiscente che si schiuderà in corrispondenza di sei fessure longitudinali. Con l'azione del vento migliaia di semi maturi vengono così liberati da ogni singola capsula. Le loro ridottissime dimensioni (< 1 mm in lunghezza), un embrione rudimentale, la forma allungata, il guscio lasso e reticolato, e l'assenza di *endosperma* rendono queste strutture adattate ad una dispersione anemocora anche su lunghe distanze.

1.3.5 Fecondazione e formazione dei semi

Esperimenti di impollinazione manuale in campo, hanno prodotto capsule su tutti i fiori, e semi prodotti quasi tutti dotati di embrione, cioè vitali.

In condizioni naturali invece esiste una differenza notevole sia in termini di quantità di capsule formate, sia in termini di vitalità dei semi in esse contenuti. Ciò è dovuto presumibilmente al fatto che un gran numero di fiori non viene visitato dagli impollinatori, ma è imputabile anche alla deposizione di polline alieno che sembra estremamente frequente nelle popolazioni miste (Scopece *et al.*, 2007). Questo fenomeno ha un peso rilevante in particolare laddove gli insetti pronubi mostrano bassi livelli di specializzazione verso una determinata specie. E' un evento molto frequente per le orchidee prive di nettare, che non offrono ricompensa. Notevole in questo senso è il contributo dello studio di Neiland e Wilcock (1994) su *Anacamptis morio*, secondo il quale col passar del tempo, si registra una diminuzione progressiva del tasso di formazione delle capsule, che si traduce in un decremento di fertilità della pianta. Dopo l'impollinazione, in circa quattro gironi, il fiore entra in senescenza. Contestualmente si ha un rapido ingrossamento dell'ovario, che può essere indotto da quantità anche minime di polline, sebbene queste determinino rese inferiori nella produzione dei semi.

1.3.6 La biologia riproduttiva delle orchidee

A maturità riproduttiva, nelle orchidee possono verificarsi due tipi di riproduzione: sessuale (*gamica*) e vegetativa o asessuata (*agamica*). La prima si verifica a seguito di fecondazione degli ovuli da parte del polline e produzione dei semi; la seconda invece avviene attraverso una moltiplicazione vegetativa a carico di un medesimo individuo, tramite formazione di rizotuberi multipli, o per gemmazione multipla del rizoma, in base alla specie.

L'androceo è costituito tipicamente da un singolo stame fertile; tra le specie italiane, fa eccezione solo *Cypripedium calceolus* L., che ne presenta due. In molti generi ogni pollinodo è dotato di una caudicola, sottile peduncolo alla cui base si può

trovare una minuta struttura discoidale adesiva detta retinacolo; in taluni casi, come in *Serapias*, il retinacolo è unico e ad esso sono collegate ambedue le caudicole (Del Prete & Tosi, 1988). L'ovario, che costituisce la parte più evidente del gineceo, è disposto inferiormente rispetto agli altri elementi florali ed al suo interno sono contenuti numerosissimi ovuli di dimensioni molto ridotte. Lo stimma si presenta di solito come una cavità disposta al di sotto dell'antera. In diversi generi, al di sopra dello stimma, si osserva una piccola prominente, detta rostello, con forma e dimensioni variabili. Questa struttura, che deriva dalla trasformazione di uno dei tre lobi stigmatici, spesso può presentare una o due sottili membrane (borsicula) che ricoprono i retinacoli, proteggendoli. Nelle orchidee lo stilo e lo stimma sono fusi con l'androceo a formare una struttura colonnare caratteristica, che in alcuni generi mostra in maniera evidente un prolungamento apicale (becco o rostro). La riproduzione nelle orchidee avviene tramite impollinazione ed è solitamente incrociata ed entomofila; talvolta, come nei generi *Neottia* e *Cephalanthera*, si può verificare autoimpollinazione, che ha come conseguenza l'autofecondazione. In condizioni ambientali particolarmente sfavorevoli si può verificare la cleistogamia, ossia l'autofecondazione senza che il fiore si apra. L'obiettivo di rendere l'impollinazione entomofila sempre più efficiente ha portato alla selezione di strutture talvolta sorprendenti, come ad esempio nel genere *Ophrys*, in cui il labello simula nell'aspetto l'addome dell'esemplare femmina dell'insetto impollinatore, rendendo specie-specifico il rapporto orchidea-insetto. Nel genere *Orchis*, lo sprone è solitamente abbastanza tozzo e mai eccessivamente lungo e si conforma bene all'apparato boccale degli insetti appartenenti soprattutto alla classe degli *Hymenoptera*. In *Gymnadenia* ed in *Anacamptis*, invece, in cui il ruolo di agenti impollinatori è svolto dalle farfalle, provviste di un apparato boccale lungo e sottile, anche lo sprone risulta essere lungo e sottile (Del Prete & Tosi, 1988). Le orchidee che si riproducono per via sessuata seguono diverse modalità. La norma è l'allogamia, ossia la riproduzione incrociata, ma sono noti anche esempi di selfing (autogamia e

agamospermia). Autogamia Alcuni fiori sono autocompatibili e il polline prodotto dalle antere può germinare sullo stigma dello stesso fiore. Questi fiori sono definiti autogami. Quando l'autoimpollinazione avviene a fioritura non ancora iniziata, si parla di cleistogamia. La fusione di gameti maschili e di gameti femminili prodotti da una stessa pianta determina a lungo andare una diminuzione significativa della variabilità e di conseguenza della stabilità genetica. La condizione autogama non rappresenta la norma tra le orchidee, tuttavia questa modalità riproduttiva si riscontra in varie specie. *Phaius tankervilleae* è un'orchidea allogama, ma esiste anche una sua forma cleistogama. I fiori della forma cleistogama non si aprono completamente e si autoimpollinano quando il polline cade sullo stigma. Quindi l'ovario si ingrossa e il labello cambia di forma e colore prima di andare incontro alla senescenza. In alcuni casi l'autogamia rappresenta una strategia adottata dalla pianta per assicurarsi comunque la riproduzione, quando, dopo un lungo periodo di normale antesi, l'impollinazione non è avvenuta ad opera degli insetti. In *Ophrys apifera*, le caudicole dei pollinodi curvano sullo stigma e determinano l'autoimpollinazione. Lo stesso fenomeno si può verificare nei generi *Epipactis*, *Herminium* ed *Orchis*. L'autogamia, oltre a costituire un'alternativa, come negli esempi sopra riportati, può essere una condizione obbligata. *Neotinea maculata* rappresenta un chiaro esempio di questa condizione. Lo sviluppo dell'autogamia sembra essere una conseguenza di una non certa impollinazione. L. van der Pijl e C. H. Dodson hanno suggerito che, per le orchidee, questo può avvenire su una vetta molto elevata o comunque in tutti quei posti nei quali ci sia una scarsa quantità di entomofauna. L' agamospermia, è un caso estremo di selfing. Questa modalità include l'apomissia, produzione di semi da tessuti materni senza l'unione sessuale delle cellule, e la partenogenesi, la produzione di piante da cellule-uova non fecondate. Anche questo fenomeno produce degli svantaggi in termini di variabilità genetica, pur risolvendo il problema della formazione dei semi. Questo meccanismo si riscontra in svariate orchidee temperate, tra le quali *Listera*

ovata, *Platanthera chlorantha*, *Cephalanthera longifolia* e *Dactylorhiza incarnata*.

Allogamia La maggior parte delle orchidee è impollinata da vettori animali, i più frequenti dei quali sono moscerini, api, scarafaggi, vespe, falene, mosche, farfalle e uccelli, benchè siano riportate anche formiche, rane e pipistrelli. La molteplicità di impollinatori rispecchia la complessità morfologica che le orchidee sono riuscite a raggiungere. In termini genetici questo tipo di riproduzione è il più conveniente, dal momento che mantiene alta la variabilità all'interno delle popolazioni. Come controindicazione però c'è il fatto che la pianta lega spesso molto strettamente il proprio destino ad un'altra specie, raddoppiando così i propri rischi.

1.3.7 Biologia dell'impollinazione delle Orchidee

Uno degli aspetti più interessanti delle orchidee è quello che lega la loro biologia riproduttiva agli insetti che fungono da impollinatori. Le relazioni che si instaurano tra le piante a fiore e gli insetti, sono generalmente viste come interazione di tipo mutualistico: la pianta provvede a ricompensare l'insetto, che visitando i suoi fiori ne ha garantito l'impollinazione, con il cibo reso sottoforma di nettare o polline (Krebs, 1985).

Nella famiglia delle *Orchidaceae* molte specie adottano una inusuale strategia riproduttiva, in quanto non offrono nessuna ricompensa, né sotto forma di nettare né di polline, per allettare gli insetti impollinatori a visitare i loro fiori (Ackerman, 1986; Dafni, 1987; Nilsson, 1992). Basti pensare al fatto che più di un terzo delle specie di orchidee non produce nettare e che in questi individui il polline è ammassato a formare dei pollinodi che si attaccano all'insetto che visita il fiore, senza che quest'ultimo abbia l'opportunità di raccogliergli per mangiarlo (Van der Pijl & Dodson, 1966; Gill, 1989). Questo fenomeno ha portato ad adottare un'infinità di

strategie di attrazione, basate soprattutto sull'inganno a seconda che le orchidee producano o meno nettare o qualsiasi altro tipo di ricompensa per i loro impollinatori. Tali strategie hanno tutte delle basi morfologiche abbastanza evidenti che permettono di identificare i probabili impollinatori di un'orchidea da una semplice analisi del suo fiore. In effetti ci sono molti gruppi di insetti che hanno stabilito rapporti con la famiglia delle *Orchidaceae* ed ognuno di essi presenta delle caratteristiche molto diverse. I primi studi sulla biologia della riproduzione delle orchidee risalgono ai lavori di Sprengel, che individuarono negli insetti i vettori del polline indispensabili per la formazione delle capsule. Successivamente anche Darwin si interessò a questo argomento, conducendo degli studi sull'adattamento delle strutture floreali di alcune orchidee tra le quali *Orchis mascula*. I lavori successivi tentarono di identificare gli effettivi impollinatori delle varie specie e di chiarire il processo dell'impollinazione della fecondazione e dello sviluppo dell'embrione. Attualmente la comprensione della relazione asimmetrica tra le orchidee europee e i loro impollinatori è da attribuirsi ai lavori di Vogel (1974) e più recentemente a quelli di Dafni (1987) e Nilsson (1992).

1.4 Scopo della tesi

Alla luce di quanto descritto finora è evidente che una serie di molteplici fattori contribuiscono alla complessa distribuzione e diversificazione delle orchidee nel territorio mediterraneo.

Nel caso specifico delle orchidee mediterranee, Sardegna e Sicilia, come anche Corsica e isole Baleari, sono considerati degli hotspot di biodiversità di grande importanza per il Mediterraneo occidentale (Delforge, 2006), ma mancano ancora evidenze scientifiche che chiariscano quanta parte di questa biodiversità sia dovuta ad eventi di colonizzazione (più o meno recenti) e/o lunghi periodi di isolamento, soprattutto tenendo conto del potenziale, attualmente ancora dibattuto (Machon *et al.*, 2003; Jacquemyn *et al.*, 2006), di dispersione dei semi estremamente minuti che caratterizzano la famiglia delle orchidee.

Da questo punto di vista gli ambienti insulare rappresentano una peculiare combinazione degli effetti di dispersione/migrazione e di isolamento geografico e temporale ed il loro effetto sinergico, in alcune circostanze, può promuovere l'insorgenza di isolamento riproduttivo e quindi speciazione con conseguente formazione di endemismi.

Per cercare di comprendere il contributo di queste dinamiche alla genesi e mantenimento della biodiversità delle orchidee mediterranee, nel presente lavoro di tesi vengono investigate l'origine e l'evoluzione di entità endemiche delle due maggiori isole del mediterraneo occidentale e vengono chiariti i processi biologici e paleo climatici che hanno determinato la loro origine e l'attuale distribuzione. In particolare l'attenzione si è focalizzata sullo studio di una nuova popolazione di *Platanthera bifolia* var. *kuenkelei* (H. Baumann) Del Forge (confr. *P. bifolia* (L.) Rich. 1817) recentemente scoperta in Sardegna (Scrugli *et al.*, 2007) e di *Neotinea commutata* (Tod.) R. M. Bateman, entità endemica siciliana. Queste due entità, rispettivamente

endemiche dell'isola sarda e siciliana, sono verosimilmente caratterizzate da differenti meccanismi di genesi e distribuzione (dispersione e speciazione) la cui adeguata comprensione può rappresentare un utile modello di studio applicabile a molte altre specie di orchidee mediterranee.

Nel caso della nuova popolazione di *Platanthera* confr. *bifolia*, valutare analiticamente le capacità di dispersione su lunga distanza, può fornire importanti informazioni per la modellizzazione di pattern di dispersione ancora poco considerati nella descrizione delle distribuzioni disgiunte, condizione comune a molte piante del Mediterraneo. Infatti, particolarmente in specie anemocore, queste possono prodursi non solo come effetto della vicarianza ma anche grazie ad eventi occasionali di dispersione di semi su distanze così lunghe (LDD) da ottenere di fatto una barriera geografica.

Quando l'isolamento geografico e/o processi di cladogenesi si susseguono ad eventi di dispersione si possono generare anche meccanismi di insorgenza dell'isolamento riproduttivo e quindi fenomeni di speciazione. In particolare, uno dei meccanismi di genesi dell'isolamento riproduttivo è legato a modificazioni del corredo cromosomico come la poliploidia. Il caso di *Neotinea commutata* offre l'occasione per indagare tali meccanismi ed il loro contributo alla genesi degli endemismi insulari.

1.5 Bibliografia

- Abbott RJ, Smith LC, Milne RI, Crawford RMM, Wolff K, Balfour J. 2000.** Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science*, 289: 1343 – 1345.
- Ackerman JD. 1986.** Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1: 108–113.
- Agusti J, Sanz de Siria A, Garces M. 2003.** Explaining the end of the hominoid experiment in Europe. *Journal of Human Evolution*, 45: 145 – 153.
- Alvarez W, Coccoza T, Wezwl TC. 1974.** Fragmentation of the alpine orogenic belt by microplate dispersal. *Nature*, 248: 309–314.
- Alvarez W. 1976.** A former continuation of the Alps. *Geological Society of America Bulletin*, 87: 891–896.
- Axelrod DI. 1975.** Evolution and biogeography of the Madrean-Thetyan sclerophyllous vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62: 280 – 334.
- Barbéro M, Loisel R, Quézel P, Richrdson DM, Romane F. 1998.** Pines of the Mediterranean Basin. In *Ecology and Biogeography of Pinus* (Ed. D.M. Richardson), pp. 153-170. Cambridge University Press.
- Barbéro M, Loisel R, Quézel P. 1992.** Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* L. ecosystems. *Vegetatio*, 99-100:19-34.
- Barboni D, Harrison SP, Bartlein PJ, Jalut G, New M, Prentice IC, Sanchez-Goñi M, Spessa A, Davis B, Stevenson AC. 2004.** Relationships between plant traits and climate in the Mediterranean region - A pollen data analysis. *Journal of Vegetation Science*, 15: 635-646.

- Béguinot A. 1922.** *La macchia foresta nella Sardegna settentrionale ed i suoi principali tipi.* Bull. Ist. Bot.R. Univ. di Sassari, Vol. I , meni. VII.
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willek KJ. 1991.** Quaternary refugia of north-european trees. *Journal of Biogeography*, 18: 103-115.
- Bennett KD. 1997.** *Evolution and Ecology* (Cambridge Univ. Press, Cambridge,U.K.).
- Berger A. 1988.** Milankovitch Theory and climate. *Reviews of Geophysics*, 26(4): 624-657.
- Bertoldi R, Rio D, Thunell R. 1989.** Pliocene-Pleistocene vegetational and climatic evolution of the south-central Mediterranean. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 72: 263 – 275.
- Bessais E & Cravatta J. 1988.** Les ecosystemes vegetaux pliocenes de Catalogne meridionale: variations latitudinales dans le domaine nord-ouest mediterraneen. *Geobios*, 21: 49–63.
- Bessedik M, Guinet P, Suc JP. 1984.** Donnees paleofloristiques en Mediterranee nord-occidentale depuis l'Aquitainien. *Révue de Paléobiologie Volume spécial*: 25–31.
- Bessedik M. 1985.** *Reconstitution des environnements miocenes des regions nord-ouest mediterraneennes a partir de la palynologie.* Montpellier, USTL: 162 pp.
- Biju-Duval B, Dercourt J, Le Pichon X. 1977.** From the Tethys ocean to the Mediterranean seas: A plate tectonic model of the evolution of the western Alpine system. Pages 143–164 in *Structural history of the Mediterranean Basin* (B. Biju-Duval, and L. Montadert, eds.). Technip, Paris.
- Blondel J & Aronson J. 1999.** *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region.* Oxford University Press.
- Bond G, Broecker W, Johnsen S, McManus J, Laneyrie L, Jouzel J, Bonani G. 1993.** Correlations between climate records from North Atlantic sediments and Greenland ice. *Nature*, 365, 143–147

- Brewer S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Reille M & Data Contributors. 2002.** The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management*, 156: 27–48.
- Bullini L, Pignatti S, Virzo de Santo A. 1999.** *Ecologia generale*. UTET, Torino.
- Bush GL 1994.** Sympatric speciation in animals—new wine in old bottles. *Trends Ecol. Evol.* 9, 285–288.
- Cherchi A & Montadert L. 1982.** Oligo-Miocene rift of Sardinia and the early history of the Western Mediterranean Basin. *Nature*, 298: 736–739.
- Clausen J, Keck DD, Hiesey WH. 1945.** Experimental studies on the nature of plant species. II. *Plant evolution through amphidiploidy and autopolyploidy with examples from the Madiinae*. Carnegie Inst. Wash. Publ., 564: 1-174.
- Coates DJ, 2000.** Defining conservation units in a rich and fragmented flora: implications for the management of genetic resources and evolutionary processes in south-west Australian plants. *Australian Journal of Botany*, 48: 329-339.
- Cohen CR. 1980.** Plate tectonic model for the Oligo-Miocene evolution of the western Mediterranean. *Tectonophysics*, 68: 283–311.
- Combourieu-Nebout N. 1993.** Vegetation response to upper Pliocene Glacial/Interglacial cyclicity in Central Mediterranean. *Quaternary Research*, 40: 228 – 236.
- Comes HP & Abbott RJ. 1999.** Reticulate evolution in the Mediterranean species complex of *Senecio* sect. *Senecio*: Uniting phylogenetic and population level approaches. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M. and Gornall, R. J. (eds) *Molecular Systematics*.
- Comes HP & Kadereit JW. 1998.** The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science, Review*, 3(11): 432 – 438.

- Comes HP, Abbott RJ. 2001.** Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean Senecio sect. Senecio (Asteraceae). *Evolution*, 55: 1934 – 1962.
- Conti E, Soltis DE, Hardig TM, Schneider J. 1999.** Phylogenetic relationships of the silver saxifrages (Saxifraga, sect. Ligulatae Haworth): implications for the evolution of substrate specificity, life histories, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 536–555.
- Costich DE & Megher TR. 1992.** Genetic variation in Ecballium elaterium (Cucurbitaceae): Breeding system and geographic distribution. *J. Evol. Biol.*, 5: 589-601.
- Cowling RM, Rundel PW, Lamont BB, Kalin Arroyo M, Arianoutsou M. 1996.** Plant diversity in Mediterranean climate regions. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 362–366.
- Coyne JA & Orr HA. 1998.** The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 353: 2878–2305
- Coyne JA. 1992.** Genetics and speciation. *Nature*, 355: 511–515.
- Cwynar LC & MacDonald GM. 1987.** Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. *Am. Nat.*, 129: 463-469.
- Dafni A. 1987.** Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception. In: *Orchid Biology, Reviews and Perspectives* (Arditti, J., ed.), pp. 79–104, Cornell University Press.
- Darwin CR. 1859.** *On the Origin of Species*. London: John Murray.
- Davis MB. 1976.** Pleistocene biogeography of temperate deciduous forests. *Geoscience Canada*, 13: 13–26.
- de Saporta G. 1863.** Etudes sur la vegetation du sud-est de la France a l'epoque tertiaire. *Annals de Science Naturelles*, 4: 5–125.
- Del Prete C, Tosi G. 1988.** *Orchidee spontanee d'Italia*. Monografia e iconografia. Milano: Mursia 172p.

- Delforge P. 2006.** *Orchids of Europe, North Africa And the Middle East.* Timber Press.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ. 1996.** Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50: 2515–2520.
- Dieckmann U & Doebeli M. 1999.** On the origin of species by sympatric speciation. *Nature*, 400: 354-357.
- Digby L. 1912.** The cytology of *Primula kewensis* and of other related *Primula* hybrids. *Annals of Botany*, 36: 357-388
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, Corre VL, Petit RJ. 1997.** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, 146: 1475–1487.
- Dynesius M & Jansson R. 2000.** Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *PNAS*, 97(16): 9115-9120.
- Elliot FC. 1958.** *Plant Breeding and Cytogenetics.* McGraw Hill Book Company, Inc.pp.136-178
- Fauquette S, Quezel P, Guiot J, Suc JP. 1998.** Signification bio-climatique de taxons-guides du Pliocene mediterraneen. *Geobios*, 31: 151–169.
- Ferris C, King RA, Väinölä R, Hewitt GM. 1998.** Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, 5: 584–593.
- Filchak KE, Roethele JB, Feder JL. 2000.** Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, 407: 739-742.
- Fortelius M, Eronem J, Liu L, Pushkina D, Tesakov A, Vislobokova I, Zhang Z. 2006.** Late Miocene and Pliocene large land mammals and climatic changes in Eurasia. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 238: 219 – 227.

- Garfunkel Z. 2004.** Origin of the Eastern Mediterranean Basin: A reevaluation. *Tectonophysics*, 391: 11–34.
- Gavrilets S. 2003.** Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution*, 57: 2197-2215.
- Gill DE. 1989.** Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In: D. Otte and J. A. Endler (eds.), *Speciation and its Consequences*. Academy of Natural Sciences Publications, Philadelphia, 458-481.
- Gillespie G & Roderick GK. 2002.** Arthropods on Islands: Colonization, Speciation, and conservation. *Annual Review of Entomology*, Vol. 47: 595-632.
- Grant VP. 1971.** *Plant speciation*. Columbia University Press. New York and London.
- Grant VP. 1981.** *Polyploidy*. Columbia University Press, New York, pp.283-352.
- Gueguen E, Doglioni C, Fernandez M. 1998.** On the post-25 Ma geodynamic evolution of the western Mediterranean. *Tectonophysics*, 298:259–269.
- Haffer J. 1977.** Secondary contact zones of birds in northern Iran. *Bonn. Zool. Monogr.* 10: 64.
- Hardin G. 1960.** The Competitive Exclusion Principle. *Science*, New Series 131(3409): 1292-1297.
- Hays JD, Imbrie J, Shackleton NJ. 1976.** Variations in the Earth's orbit: pacemaker of the ice ages. *Science*, 194: 1121-1132.
- Hedrén M, Nordström S, Stålberg D. 2008.** Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, 17: 5075–5091.
- Hieter P & Griffith T. 1999.** Polyploidy- more is more or less. *Science*, 285: 210-211.

- Hilu KW. 1993.** Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *Am. J. Bot.*, 80 (12): 1494-1499.
- Hopper SD, Gioia P. 2004.** The southwest Australian floristic region: evolution and conservation of a global hot spot of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35: 623–650.
- Hsü KJ, Ryan WBF, Cita MB. 1973.** Late Miocene Desiccation of the Mediterranean. *Nature*, 242(23): 240-244.
- Hsü KJ. 1971.** Origin of the Alps and Western Mediterranean. *Nature*, 233: 44–48.
- Huntley B & Birks HJB. 1983.** *An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0–13000 Years Ago*, Cambridge University Press.
- Ivanov D, Ashraf AR, Mosbrugger V, Palamarev E. 2002.** Palynological evidence for Miocene climate change in the Forecarpathian Basin (Central Parathetys, NW Bulgaria). *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 178: 19 -37.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Honnay, O., Hermy, M. & Roldán-Ruiz, I. 2006.** Sexual reproduction, clonal diversity and genetic differentiation in patchily distributed populations of the temperate forest herb *Paris quadrifolia* (Trilliaceae). *Ecologia*, 147: 434–444.
- Jolivet L, Augier R, Robin C, Suc JP, Rouchy JM. 2006.** Lithospheric scale geodynamic context of the Messinian salinity crisis. *Sedimentary Geology*, 188–189: 9–33.
- Kihara H, Ono T. 1926.** Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschr. Zellforsch.u.mikr.Anatomie*. 4: 475-481.
- King RA & Ferris C. 1998.** Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Mol. Ecol.*, 7: 1151–1161.
- Konnert M & Bergmann F. 1995.** The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history, *Plant Syst. Evol.*, 196: 19–30.

- Krebs CJ. 1985.** *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance.* Harper and Row. New York.
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FG, Wilson DS. 1999.** Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400: 652–655
- Levin DA. 1978.** The origin of isolating mechanism in flowering plants. *Evol. Biol.*, 11: 185-315.
- Levin DA. 1983.** Polyploidy and novelty in flowering plants., *Amer. Nat.*, 122(1): 1-24.
- Levin DA. 2002.** *The role of chromosomal change in plant evolution.* Oxford University Press.
- Lewis WH, (ed.) 1980,** Polyploidy: biological relevance. Plenum Press, New York.
- Lieberman, B.S. 2000.** *Paleobiogeography.* New York: Plenum/Kluwer Academic.
- Linder HP. 2003.** The radiation of the Cape flora, southern Africa. *Biological Reviews*, 78: 597–638.
- Lomolino, M.V. 2006.** The island role and a research agenda for studying ecogeographical patterns. *J. Biogeogr.*, 33: 1503–1510.
- Lumaret R, Yacine A, Berrod A, Romane F, Li TX. 1991.** Mating system and genetic diversity in holm-oak (*Quercus ilex* L. *Fagaceae*). In *Biochemical markers in the population genetics of forest trees* (Ed. S. Fineschi, M.E. Malvoti, F. Cannata, H.H. Hattemer), pp. 145-153. S.P.B. Academic Publishing, The Hague.
- Luria SE, Gould SJ, Singer S. 1981.** *A view of Life.* Benjamin/Cummings Pub. Co. (Menlo Park, CA).
- Machon, N., Bardin, P., Mazer, S.J., Moret, J., Godelle, B. & Austerlitz, F. 2003.** Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytol.*, 157: 677–687.
- Mansion G, Rosenbaum G, Schoenenberger N, Bacchetta G, Rossello JA, Conti E. 2008.** Phylogenetic analysis informed by geological history

supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family Araceae. *Systematic Biology*, 57: 269–285.

Mather K. 1953a. The genetical structure of populations. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 7: 66-95.

Matzke AJM & Matzke MA. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:142–148

Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.*, 43: 401–415.

Mayr E. 1940. Speciation phenomena in Birds. *American Naturalist*, 74: 249-278.

McGlone MS. 1996. When history matters: scale, time, climate and tree diversity. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 5: 309-314.

Médail F & Quézel P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84: 112-127.

Meulenkamp JE & Sissing W. 2000. *Tertiary*. Pp: 153 – 208. in: Crasquin S. (ed.), Atlas Peri-Thetys, Paleogeographical Maps – Explanatory notes. CCGM/CGMW, Paris. Miocene evolution of the western Mediterranean.

Meulenkamp JE & Sissing W. 2003. Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African-Eurasia convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 196(1-2): 209-228.

Meyer A., Kocher TD, Basasibwaki KP, Wilson ACW. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347: 550-553.

Michaud H, Toumi L, Lumaret R, Li TX, Romane F, di Giusto F. 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (Holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity*, 74: 590-606.

- Milankovitch M. 1941.** Canon of Insolation and the Ice-Age Problem. *Israel Program for Scientific Translations*. Jerusalem (1969).
- Nilsson LA. 1992.** Orchid pollination biology. *Trends Ecol. Evol.* 7: 255–259.
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA. 2003.** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids, *Trends Genet.*, 19(3):141-147.
- Otto SP & Whitton J. 2000.** Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.*, 34: 401-437.
- Palamarev E. 1989.** Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics and Evolution*, 162: 93–107.
- Petit RJ, Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V. 1997.** Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics*, 146: 1475-1487
- Pignatti S. 1979.** I piani di vegetazione in Italia. *Giornale Botanico Italiano* 113(5-6): 411-428.
- Pignatti S. 1995.** Ecologia vegetale. *UTET*.
- Pignatti S. 1998.** La foresta sempreverde mediterranea. In: S. Pignatti – I boschi d'Italia. *Sinecologia e biodiversità*. Utet, Torino: 393-448.
- Pons A & Quézel P. 1985.** The history of the flora and vegetation and past and present human disturbance in the Mediterranean region. *Plant conservation in the Mediterranean area*, C. Gomez-Campo (ed.). Dordrecht, Dr W. Junk Publishers: 25–43.
- Pons A, Suc JP, Reille M, Combourieu-Nebout N. 1995.** The history of dryness in regions with a Mediterranean climate. In *Time scales of biological responses to water constraints*, J. Roy, J. Aronson and F. di Castri (eds.). Amsterdam, SPB Academic Publishing: 169–188.

- Pons A. 1984.** Les changements de la vegetation de la region Mediterrane durant la Pliocene et le Quaternaire en relation avec l'histoire du climat et l'action de l'homme. *Webbia*, 38: 427–439.
- Quézel P, Medail F. 2003.** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Elsevier, Paris, France.
- Quézel P. 1978.** Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65: 479–534.
- Quézel P. 1985.** Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. In Gomèz Campo (ed.), *Plant conservation in Mediterranean area*. D.L. Junk Publ., Dordrecht: 9 – 22.
- Quézel P. 1995.** La Flore du basin méditerranéen: origine, mise en place, endémisme. *Ecologia Mediterranea*, XXI (1/2): 152 – 161.
- Ramsey J & Schemske DW. 1998.** Pathways, Mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 467–501.
- Ramsey J & Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 589–639.
- Rice WR & Hostert EE. 1993.** Laboratory experiments on speciation—what have we learned in 40 years. *Evolution*, 47: 1637–1653.
- Rieseberg LH. 2001.** Polyploid evolution: keeping the peace at genomic reunions. *Curr. Biol.*, 11(22): 925–8.
- Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C. 2002a.** Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *J. Virtual Explorer*, 8: 107–130.
- Savolainen V, Anstett MC, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup MV, Powell MP, Springate D, Salamin N, William J. Baker. 2006.** Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, 441: 210–213.
- Schliwen UK, Tautz D, Pääbo S. 1994.** Sympatric speciation suggested by crater lake cichlids. *Nature*, 368:629–632.

- Schultz RJ. 1980.** Role of polyploidy in the evolution of fishes. Cfr. Lewis, 1980
ibidem. 13, 313–40.
- Scopece G, Musacchio A, Widmer A, Cozzolino S. 2007.** Patterns of
rproductive isolation in mediterranean orchids. *Evolution*, 61(11): 2623–
2642.
- Scrugli A, Sotgiu F, Solinas G, Cogoni A. 2007.** Eccezionale ritrovamento in
Sardegna di *Platanthera bifolia* (L.) L.C.M Richard (Orchidaceae).
Caesiana, 5: 7–12.
- Shackleton NJ & Opdyke ND. 1973.** Oxygen isotope and palaeomagnetic
stratigraphy of equatorial Pacific core 28-238: oxygen isotope
temperatures and ice volumes on a 105 year and 106 year scale, *Quat.*
Res., 3: 39–55.
- Smith MJ. 1966.** Sympatric speciation. *Am. Nat.*, 100: 637–650.
- Soltis DE & Soltis PS. 1995.** The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. 92(18): 8089-91.
- Soltis DE & Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution.
Tree, 14(9): 348-352.
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC. 1995.** Rapid genome change in synthetic
polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proc.*
Natl. Acad. Sci., 92(17):7719-23.
- Sorenson MD, Sefc KM, Payne RB. 2003.** Speciation by host switch in brood
indigo birds. *Nature*, 424: 928-931.
- Specht RL. 1969.** A comparison of the sclerophyllous vegetation characteristics of
mediterranean type climates in France, California, and southern
Australia. I. Structure, morphology, and succession. *Australian Journal*
of Botany, 17: 277-292.
- Sprengel CK. 1793.** *Das Entdeckte Geheimniss in der Natur im Bau und in der*
Befuchtung der Blumen. Berlin.

- Stebbins GL, Jr. 1947.** Types of Polyploids: their classification and significance. *Advn. Genet.*, 1: 403-432.
- Stebbins GL, Jr. 1985.** Polyploidy, Hybridization and the invasion of new habitats. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 72: 824-832.
- Stebbins GL. Jr. 1958.** The inviability, sterility and weakness of inter-specific hybrids. *Adv. Genet.*, 9: 147-215.
- Stebbins GL. Jr., 1950.** *Variation and Evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Strand AE, Milligan BG, Pruitt CM. 1996.** Are populations islands? Analysis of chloroplast DNA variation in *Aquilegia*. *Evolution*, 50: 1822-1829.
- Strand AE, Milligan BG, Pruitt CM. 1996.** Are populations islands? Analysis of chloroplast DNA variation *Aquilegia*. *Evolution*, 50, 1822-1829.
- Suc JP. 1984.** Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature*, 307: 429 – 432.
- Swanson CP, Merz T, Young WJ. 1981.** *Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution*. Englewood Cliffs, Prentice-Hall.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy, Cosson JF. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4): 453-464.
- Thompson JD & Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends Ecol. Evol.*, 7, 302-307.
- Thompson JD, Lavergne S, Affre L, Gaudeul M, Debussche M. 2005.** Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants. *Taxon*, 54: 967-976.
- Thompson JD. 1999.** Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, 82: 229-236.

- Thompson JD. 2005.** *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.
- Tomaselli R. 1981.** Main physiognomic types and geographic distribution of shrub systems related to mediterranean climates. In *Mediterranean-type shrublands* (ed. F. di Castri, D.W. Godall, R.L. Specht): 95-106. Collection Ecosystems of the World, Vol. 11. Elsevier, Amsterdam.
- Tregenza T & Butlin RK. 1999.** Speciation without isolation. *Nature*, 400: 311-312.
- Van Dam JA, 2006.** Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12-3 Ma) aridification of Europe: the use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 238: 190 – 218.
- Van der Pin L & Dodson CH. 1966.** *Orchid Flowers: Their Pollination and Evolution*. University of Miami Press. Coral Gables, FL. 214 pp.
- Vögel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Tropische und Subtropische Pflanzenwelt 7: 285–547.
- Vuilleumier F. 1977.** Suggestions pour des recherches sur la spéciation des oiseaux en Iran. *Terre et Vie*. 31: 459-488.
- Wang H, McArthur ED, Sanderson SC, Graham JH, Freeman DC. 1997.** Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae). IV. *Reciprocal transplant Experiments*. *Evolution*, 51(1): 95-102.
- Webb T & Bartlein PJ. 1992.** Global changes during the last 3 million years. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 23: 141–173.
- Westphal M, Orsini J, Vellutini P. 1976.** Le microcontinent corse-sarde, sa position initiale, données paleomagnetiques et raccords géologiques. *Tectonophysics*, 30: 141–157.
- Willis KJ & Whittaker RJ. 2000.** The refugial debate. *Science*, 287: 1406–1407.

Winge O. 1917. The chromosomes. Their numbers and general significance. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg*, 13: 131-275.

Wolfe KH. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.*, 2(5): 333-41.

Capitolo 2

Filogeografia di una popolazione sarda isolata di *Platanthera bifolia* var. *kuenkelei* (H. Baumann) Del Forge

2.1 Introduzione

La distribuzione delle piante nelle isole è determinata dagli effetti e dalle combinazioni di diversi fattori. L'approccio allo studio di tali fattori è basato classicamente sulla correlazione tra i *pattern* distributivi degli organismi e i processi paleo-geologici, che possono produrre isolamento o connessioni tra popolazioni, attraverso la formazione temporanea di barriere o corridoi terrestri alla dispersione ("Geo-dispersione" *sensu* Lieberman, 2000). Nonostante la grande diffusione di tali fenomeni di Geo-dispersione graduale, in numerose specie si manifestano meccanismi di dispersione dei semi su lunga distanza (LDD, Long Distance Dispersal), caratterizzati da pattern distributivi tipici. Ad oggi, soltanto pochi contributi scientifici sono incentrati su questo peculiare meccanismo di colonizzazione, evidenziando nondimeno il suo ruolo fondamentale nella distribuzione delle attuali popolazioni naturali (Howe & Swallowood, 1982; Ramakrishnan *et al.*, 2010) ed i diversi modi in cui si manifesta mediante la dispersione dei semi guidata dal vento (Nathan *et al.*, 2002; Nathan, 2006). Questa sottostima è spesso dovuta al fatto che se molte specie esibiscono adattamenti morfologici che si presume incrementino le capacità di dispersione, un numero altrettanto grande di specie apparentemente manca di qualunque adattamento specifico allo scopo (e.g. in *Cistus*: Guzman & Vargas, 2009).

La composizione in specie dei bioti insulari attuali è tipicamente un mosaico prodotto dai contributi relativi di vicarianza, Geo-dispersione e LDD. Di conseguenza, definire il peso relativo di ognuno di questi processi rappresenta un obiettivo ambizioso e importante per la biogeografia delle piante (Lomolino *et al.*, 2006). La dispersione LDD dei semi è stata spesso considerata un fattore indispensabile per la colonizzazione

di isole oceaniche (Nathan *et al.*, 2008), data l'assenza di iniziali connessioni geologiche con i continenti da un lato, e dall'altro la disponibilità di numerose nicchie ecologiche libere (Gillespie & Roderick, 2002) come, per esempio, nell'arcipelago Mascarene (Micheneau *et al.*, 2008). Al contrario, è più complesso stimare il contributo effettivo della LDD nella composizione di bioti insulari, nel caso in cui l'isola abbia sperimentato una lunga storia geologica di connessioni con la terraferma passate o ricorrenti in diversi momenti spaziali e temporali: una condizione tipica delle isole continentali del bacino del Mediterraneo. Questo importantissimo *hot-spot* di biodiversità (Myers *et al.*, 2000) offre un classico *pattern* geografico composto di barriere e corridoi terrestri alla dispersione via terra, risultato di una storia geografica complessa che ha differenziato le aree occidentali da quelle orientali del bacino del Mediterraneo.

All'interno del bacino mediterraneo occidentale, la Sardegna, insieme con la Corsica e le Isole Baleari, era parte dei residui di una catena montuosa di epoca paleozoica, presente nella penisola iberica nel primo Oligocene (Mansion *et al.*, 2008), che è migrata verso est dalla placca iberica verso la regione sud-occidentale del bacino. Durante tale movimento tettonico, la placca corso-sarda ha attraversato una lunga storia di isolamento geografico, che è stato considerato il fattore principale nella genesi della ricca flora autoctona di oggi (Cardona & Contandriopoulos, 1979; Camarda *et al.*, 1992). Il confronto con le altre aree del bacino del Mediterraneo mostra come la placca corso-sarda possieda una flora altamente differenziata (Heywood, 1995) che include un gran numero di specie endemiche (Médail & Quézel, 1997; Bacchetta *et al.*, 2005), alcune delle quali, come dimostrato da recenti studi biogeografici, potrebbero essersi sviluppate durante il lungo periodo di isolamento (Mansion *et al.*, 2009).

Cionondimeno, diverse specie sarde, considerate endemiche, non mostrano una sostanziale separazione filogenetica rispetto alle specie affini presenti sulle altre isole mediterranee o sulle piattaforme continentali limitrofe, suggerendo la possibilità

di spiegazioni diverse per le loro origini. Ad esempio, a dispetto della considerevole proporzione di *taxa* endemici, una gran parte della flora sarda si sovrappone a quelle delle piattaforme di terraferma circostanti, come il Nord Africa (Cardona & Contandriopoulos, 1977, 1979; Contandriopoulos, 1990; Gamisan & Jeanmonod, 1995), forse come conseguenza dei ponti di terra temporanei apparsi durante la crisi di salinità del Messiniano risalente a circa 5 milioni di anni fa (Hsü *et al.*, 1973), o come l'Italia centrale durante le più recenti glaciazioni del Pleistocene (Petit *et al.*, 2003). Tali ipotesi paleoclimatiche suggeriscono la necessità di più accurate indagini comparative filogenetiche e filogeografiche sulle specie sarde, che dovrebbero consentirci di distinguere i tempi e i modi dei differenti eventi di colonizzazione che hanno contribuito alla ricchezza in specie dell'isola.

Inoltre, confronti della diversità genetica, tra popolazioni insulari e continentali strettamente imparentate, hanno frequentemente evidenziato una ridotta diversità genetica nelle popolazioni delle isole, conseguenza presumibile dell'effetto fondatore, una bassa dimensione media della popolazione e/o deriva genica. In particolare, per le popolazioni insulari che hanno sperimentato una lunga storia di isolamento geografico, questa riduzione dipende tipicamente dalla quantità e dalla frequenza di scambio genico con le popolazioni continentali (Frankham, 1997).

Le orchidee, caratterizzate da semi di piccolissime dimensioni, rappresentano un modello ideale per testare le dinamiche di dispersione utilizzando un approccio filogeografico che tenga conto dell'influenza dei cicli climatici del Quaternario, della geodispersione e della LDD. Nelle orchidee, i semi, estremamente piccoli, sono facilmente trasportati dal vento (Gandawijaja & Arditti, 1983), grazie alla mancanza di endosperma e al tegumento di tessuto che avvolge l'embrione ed agisce come un pallone in miniatura (Arditti & Ghani, 2000). Ad ogni modo, il loro potenziale di dispersione su lunga distanza è stato spesso contestato a causa della speciale necessità

di simbiosi micorriziche specie-specifiche per il successo della germinazione (Jeràková & Malinova, 2007).

La Sardegna ospita un gran numero di specie di orchidee Mediterranee, incluse alcune supposte endemiche, ed è per questo considerata un *hot-spot* per la loro diversità (Scrugli, 1990; Delforge, 2006). Al momento, non si sa quanto la diversità delle orchidee sarde sia dovuta alla colonizzazione attraverso rotte differenti e quanto alla sua lunga storia di isolamento.

In questo studio, è stata utilizzata come modello una specie sarda del genere *Platanthera* (L.) Richard 1817, ampiamente distribuito lungo le zone subartiche e temperate dell'emisfero nord (Hapeman & Inoue, 1997). Nel bacino del Mediterraneo, *Platanthera* è presente con due sole specie largamente diffuse (Bateman *et al.*, 2009), *P. chlorantha* (Custer) Rchb., 1829 e *P. bifolia* (L.) Rich. 1817, e con altri *taxa* meno diffusi e con distribuzione frammentaria, come ad esempio *P. algeriensis* Batt. & Trabut 1892 presente in Spagna, Algeria, Marocco e Sardegna, *P. bifolia* var. *kuenkelei* (H. Baumann) Del Forge presente in Nord Africa, e *P. holmboei* H. Lindberg presente in Turchia, Palestina e sull'isola di Cipro. Questi ultimi *taxa* rappresentano potenzialmente un sistema utile per testare ipotesi relative a possibili fenomeni di vicarianza e LDD nella distribuzione di *Platanthera*.

In questo lavoro, attraverso analisi filogeografiche, è stata indagata l'origine di una popolazione sarda di *Platanthera*, scoperta di recente, e confrontata con campioni provenienti da diverse regioni del Mediterraneo, al fine di descrivere eventuali fenomeni di dispersione su lunga distanza; specificamente, quanto siano stati frequenti, e quali rotte preferenziali siano state seguite. Inoltre, attraverso il confronto della variabilità genetica tra popolazioni insulari e continentali di *Platanthera*, si è cercato di stimare se, le popolazioni insulari mantengano livelli di variabilità genetica più bassi delle popolazioni continentali. Per raggiungere questo scopo sono stati impiegati marcatori genetici plastidiali (cpDNA) che, essendo ereditati per linea materna,

dovrebbero identificare i *pattern* genetici tipici di dispersione su lunga o breve distanza e/o gli effetti di vicarianza, e consentire così la stima del livello locale di variabilità genetica nelle popolazioni insulari.

2.2 Risultati

Da uno screening iniziale di 20 *loci* di DNA plastidiale non codificanti (Ebert & Peakall, 2009), sono stati scelti per l'analisi di tutti i campioni esaminati due *loci*, gli spaziatori *psbK-trnS*(GCU) e *psaA-ycfex3*, che hanno mostrato sia un segnale di amplificazione chiaro e riproducibile che una significativa variabilità di sequenza.

L'allineamento complessivo di queste due regioni di cpDNA è costituito da circa 1062 bp e ha prodotto 19 aplotipi. Questi, identificati in ordine alfabetico (A – U) sono illustrati con le rispettive distribuzioni geografiche in tabella 2.1.

L'insieme dei siti risultati variabili tra i 19 aplotipi sono mostrati in tabella 2.2. I siti variabili sono costituiti da quattro sostituzioni di base e da sei ripetizioni mononucleotidiche variabili (poli(A), poli(T) e (AT)). In *Platanthera bifolia* sono stati identificati nove aplotipi (C, D, E, F, G, H, I, L, M), con l'aplotipo C condiviso dai campioni austriaco e da quello norvegese. I campioni di *Platanthera chlorantha* hanno espresso sei aplotipi (A, B, N, O, P, Q): un aplotipo (O) è stato ritrovato in Sicilia; due in Toscana (P, Q) e tre in Campania (A, B, N). I campioni di *Platanthera algeriensis* hanno invece prodotto l'aplotipo A e l'aplotipo B, entrambi condivisi con i campioni di *Platanthera chlorantha*. Infine, quattro aplotipi (R, S, T, U) sono stati identificati nella popolazione sarda Sa Ucca. Di questi, l'aplotipo T è stato ritrovato anche nel campione tunisino di *Platanthera bifolia* var. *kuenkelei* (Tab. 2.1; Fig. 2.2). Per la popolazione Sa Ucca, tutti gli aplotipi sono stati identificati con il 95% di certezza, in base alla distribuzione di probabilità di Stirling (Dixon, 2006)

Tabella 2.1. Campionamento degli esemplari e relativi aplotipi plastidiali identificati

Taxon	N° di campioni per popolazione	Località	Coordinate		Aplotipo
			N	E	
<i>P. bifolia</i>	4	Val Madrera, Lombardia, Italia	45.83	9.35	D, E
<i>P. bifolia</i>	9	Fiesole, Toscana, Italia	43.50	11.80	D, F, G, H, I, L, M
<i>P. bifolia</i>	1	Tirolo, Austria	47.23	11.60	C
<i>P. bifolia</i>	1	Håpet Tromsø, Norvegia	69.67	18.92	C
<i>P. chlorantha</i>	1	Bosco Malabotta, Sicilia, Italia	37.93	15.05	O
<i>P. chlorantha</i>	4	Sassano, Campania, Italia	40.30	15.33	A, B, N
<i>P. chlorantha</i>	5	Fiesole, Toscana, Italia	43.52	11.85	P, Q
<i>P. algeriensis</i>	10	Monte Limbara, Sardegna,	39.85	9.05	A, B
<i>P. bifolia</i> var. <i>kuenkelei</i>	10	Sa Ucca, Sardegna, Italia	40.80	9.45	R, S, T, U
<i>P. bifolia</i> var. <i>kuenkelei</i>	1	Tunisia	--	--	T

Tabella 2.2. Allineamento degli aplotipi plastidiali

Aplotipi plastidiali	<i>psbK-trnS(GCU) spacer</i>				<i>psaA-ycfex3 spacer</i>					
A	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₂ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
B	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₂ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₁ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
C	-C-	-(AT) ₈ -	-A-	-A ₉ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₂ -	-T ₉ -	-T ₄ -
D	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₉ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₁ -	-T ₉ -	-T ₄ -
E	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₉ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₂ -	-T ₉ -	-T ₄ -
F	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₅ -
G	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-T-	-A ₈ -	-G-	-A ₉ -	-T ₁₁ -	-T ₅ -
H	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₂ -	-T-	-A ₈ -	-G-	-A ₉ -	-T ₁₁ -	-T ₄ -
I	-C-	-(AT) ₇ -	-G-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₉ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₁₁ -	-T ₄ -
L	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
M	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₉ -	-T ₁₁ -	-T ₄ -
N	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₂ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₁ -	-T ₉ -	-T ₄ -
O	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₁ -	-T ₉ -	-T ₄ -
P	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₀ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
Q	-C-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₁ -	-G-	-A ₈ -	-G-	-A ₁₀ -	-T ₉ -	-T ₄ -
R	-T-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₀ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
S	-T-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₈ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₀ -	-T ₁₀ -	-T ₄ -
T	-T-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₁₀ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₀ -	-T ₉ -	-T ₄ -
U	-T-	-(AT) ₇ -	-A-	-A ₈ -	-G-	-A ₈ -	-A-	-A ₁₀ -	-T ₉ -	-T ₄ -

La popolazione Sa Ucca ha mostrato una ricchezza aplotipica ($H_k = 0,64$) maggiore sia rispetto a *P. algeriensis* dalla Sardegna ($H_k = 0,36$) che a *P. chlorantha* dalla Toscana ($H_k = 0,60$), ma comunque minore di quella riscontrata in *P. bifolia* dalla Lombardia ($H_k = 0,67$), in *P. bifolia* dalla Toscana ($H_k = 0,94$) e in *P. chlorantha* dalla Campania ($H_k = 0,83$). Utilizzando un Mantel test ($R = 0,39$; $P = 0,22$), per tutte le specie in esame, non è stata riscontrata nessuna correlazione tra le distanze geografiche e genetiche tra individui.

Il test di neutralità effettuato mediante il test F_s di Fu (1,36; $P = 0,77$) ha mostrato valori non significativamente diversi da zero, indicando un numero di alleli rari che corrisponde alle attese dell'ipotesi neutrale nulla in una popolazione all'equilibrio. La *mismatch distribution* osservata per $n = 50$ individui della popolazione Sa Ucca ha mostrato un andamento unimodale e regolare che corrisponde a un modello di popolazione in espansione costante ($SSD = 0,02$; $p = 0,37$; Indice di eterogeneità = 0,11; $p = 0,57$), come mostrato dalla figura 2.1.

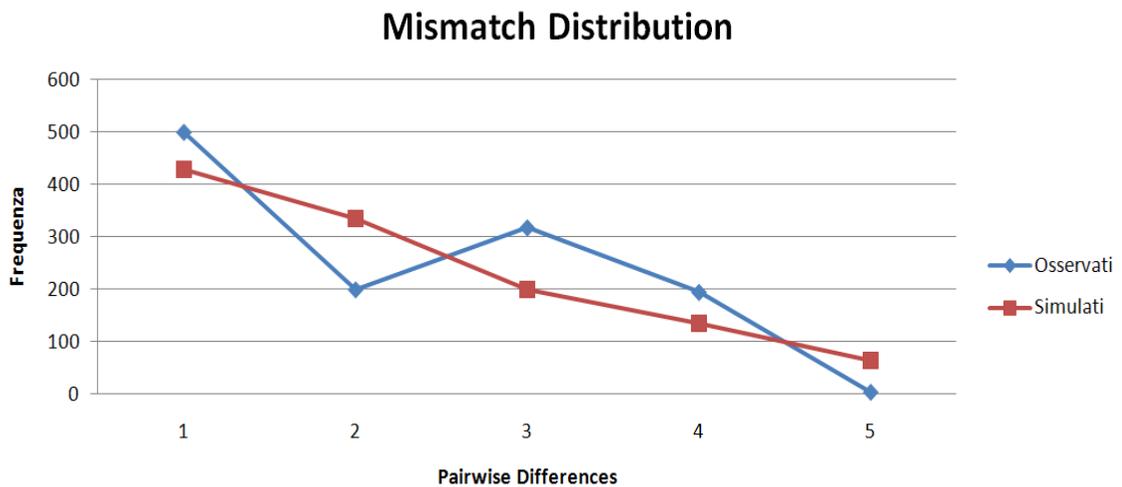


Figura 2.1. Diagramma di Mismatch Distribution che confronta valori osservati e attesi del numero di differenze negli aplotipi di cpDNA in una coppia di campioni di *P. bifolia* var. *kuenkelei*. Il numero di differenze tra due campioni è espresso sull'asse orizzontale; la frequenza con cui un numero di differenze è stato rilevato è espressa sull'asse verticale. Le linee blu rappresentano i valori riscontrati nell'analisi; le linee rosse quelli attesi in base alla simulazione.

Il network di massima parsimonia prodotto sulla base degli aplotipi plastidiali identificati è mostrato in figura 2.2. Ognuno dei 19 aplotipi è connesso ad altri aplotipi, prevalentemente per mezzo di singole mutazioni, e solo in pochi casi troviamo tre mutazioni a separare due aplotipi.

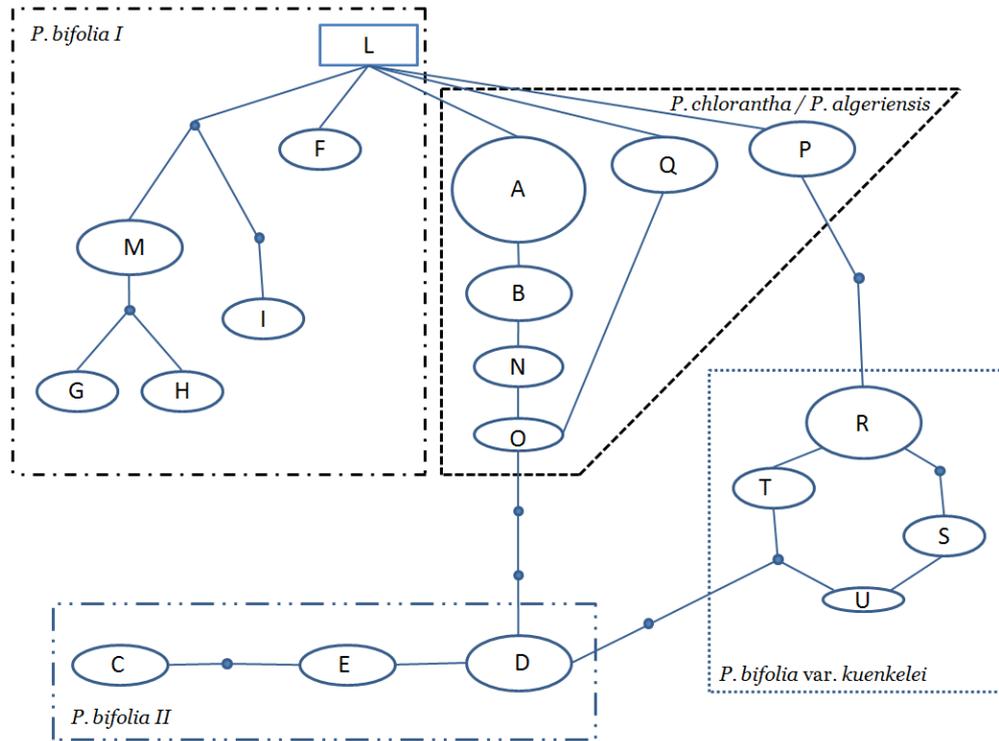


Figura 2.2. Network di massima parsimonia degli aplotipi plastidiali (limite di connessione: 95%). Gli aplotipi sono indicati da lettere maiuscole, da A ad U. Le linee rappresentano collegamenti tra aplotipi che differiscono tra loro per un solo evento mutazionale. I punti piccoli intermedi rappresentano ipotetici aplotipi dedotti dall'analisi, ma non rinvenuti nel data-set. La dimensione delle ellissi è direttamente proporzionale alla frequenza aplotipica (Le ellissi più piccole corrispondono agli aplotipi rinvenuti in singoli individui).

La rete così ottenuta evidenzia la distanza relativamente grande dei quattro aplotipi (S, R, T, U) identificati nella popolazione Sa Ucca dalle altre popolazioni analizzate, in particolare rispetto agli aplotipi di *P. bifolia* (F, G, H, I, L, M) provenienti dalle popolazioni dell'Italia centrale geograficamente più prossime. Al contrario, è stato identificato un aplotipo (T) comune al campione di *P. bifolia* var. *kuenkelei* proveniente dalla Tunisia. Questa evidenza supporta chiaramente l'ipotesi che la popolazione Sa Ucca possa sarda essere ascritta alla linea filetica di *P. bifolia* var. *kuenkelei* piuttosto che a quella di *P. bifolia* continentale.

2.3 Discussione

Tra le isole del Mediterraneo, la Sardegna è caratterizzata da un'alta proporzione di *taxa* endemici, ma solo una piccola frazione di questi può essere spiegata da interpretazioni biogeografiche come conseguenza del lungo periodo di isolamento geografico durante i movimenti di placca del Terziario (Mansion *et al.*, 2008; Salvo *et al.*, 2008). Come già evidenziato in numerosi confronti floristici, approssimativamente il 56% della flora sarda è comune a quella siciliana (e fondamentale a quella dell'Italia continentale) arrivando al 65% di corrispondenza nel confronto con la vicina Corsica (Cardona & Contandriopoulos, 1979; Camarda, 1992, Gamisan & Jeanmonod, 1995; Médail & Quézel, 1997), cosa che fornisce un'indicazione di dispersione ricorrente tra le placche geologiche. Generalmente si assume che le rotte principali di colonizzazione delle piante dall'Europa continentale verso la Sardegna abbiano operato attraverso le montagne dell'Appennino, l'arcipelago toscano e la Corsica, in particolare durante le glaciazioni del Quaternario, quando ponti temporanei si formarono probabilmente tra l'Italia centrale e la Corsica (Petit *et al.*, 2003). L'esistenza di queste connessioni terrestri è suggerita dagli areali di presenza di diverse altre specie di piante, che mostrano la tipica distribuzione disgiunta tra Italia centrale e Sardegna (ad esempio *Ilex aquifolium*, *Populus tremula*, *Taxus baccata*, *Viola biflora*) ma questa assunzione è supportata solo da poche indagini filogeografiche (Grassi *et al.*, 2009). Al contrario, questo studio ha rivelato che campioni provenienti dalla popolazione sarda Sa Ucca mostrano una chiara connessione con la linea filetica di *P. bifolia* var. *kuenkelei* nordafricana, piuttosto che con le popolazioni di *P. bifolia* toscane geograficamente più vicine. E' interessante che

questo *pattern* di relazioni si rispecchi anche nell'areale di distribuzione dell'altra specie insulare di *Platanthera*, *P. algeriensis*, che si rinviene in Spagna e in Nord Africa ma non nella penisola italiana.

Il forte limite del nostro campionamento (un solo campione dalla Tunisia) non ci permette di inferire le origini di questo interessante *pattern* di relazioni tra popolazioni sarde e tunisine di *P. bifolia* var. *kuenkelei*, lasciando così ancora aperta la possibilità di ipotesi di geodispersione con conseguente frammentazione dell'areale e quella di un evento di dispersione a lunga distanza (LDD). La prima ipotesi è supportata dalla condivisione di medesimi aplotipi tra queste regioni isolate (Sardegna e Tunisia) e dal livello comparabile di ricchezza aplotipica della popolazione sarda. Ciononostante, questo scenario sembra molto improbabile, poiché l'ultima connessione tra Sardegna e Tunisia è datata durante la crisi di salinità del Messiniano, quando la piattaforma sardo-corso-baleare era connessa alla Sicilia ed al Nord Africa per mezzo di un ampio e continuo ponte di terre emerse che delimitava un mare chiuso poco profondo (Hsü *et al.*, 1973; Rosenbaum *et al.*, 2002). Infatti, se questo fosse il caso, un periodo di isolamento così lungo (circa 5 milioni di anni) avrebbe dovuto lasciare un segnale molto più profondo nei *pattern* cladogenetici in queste linee filetiche strettamente imparentate e nell'entità della loro differenziazione genetica.

Un'ipotesi di evento di LDD sembra perciò una spiegazione più plausibile per la presenza sull'isola di *P. bifolia* var. *kuenkelei*: l'assenza di correlazione tra distanza genetica e distanza geografica tra popolazioni (su tutte le specie) indica che gli eventi LDD siano una spiegazione potenziale dei *pattern* geografici noti. Ad ogni modo, la presenza di quattro aplotipi nell'unica popolazione sarda di Sa Ucca e i risultati dell'analisi *mismatch* non supportano l'ipotesi di un recente effetto fondatore, che avrebbe condotto alla fissazione di un singolo aplotipo plastidiale. Di conseguenza, a causa della relazione molto stretta tra l'aplotipo condiviso con la Tunisia e gli altri tre aplotipi insulari (differenti solo per singole mutazioni puntiformi), si potrebbe

considerare plausibile un evento antico di LDD e la conseguente evoluzione *in loco* dei tre aplotipi derivati (S, R, U) dall'aplotipo T (fondatore putativo) condiviso con la Tunisia. Ovviamente, a causa del campionamento estremamente povero di esemplari tunisini, la struttura della rete di aplotipi non esclude completamente l'ipotesi che *P. bifolia* var. *kuenkelei* si sia diffusa al contrario dalla Sardegna alla Tunisia. In quest'ultimo caso, si dovrebbe però ipotizzare un'improbabile origine insulare della *P. bifolia* var. *kuenkelei* sarda da un ancestore locale estinto all'interno del gruppo *P. bifolia*.

Non è possibile definire la finestra temporale di questo antico evento di LDD. Comunque, sia il reperimento di quattro aplotipi nell'unica popolazione sarda, sia l'apparente assenza dall'isola di *P. chlorantha* e *P. bifolia*, entrambe ad ampia diffusione continentale comprendente numerosi contesti ecologici differenti (dalla Scandinavia al bacino del Mediterraneo e verso est fino alla Cina), suggeriscono insieme che simili eventi di LDD siano relativamente rari. In effetti, a dispetto delle apparenze comuni, spesso le orchidee sono state considerate dotate di scarsa capacità di dispersione. Il successo di un evento di colonizzazione dipende da una combinazione di numerose condizioni ecologiche, come la necessità di specifiche interazioni micorriziali che assicurino la germinazione del seme, o la presenza di impollinatori specifici per il consolidamento delle popolazioni colonizzanti (Machon *et al.*, 2003; Jacquemyn *et al.*, 2006). Non si possiedono al momento evidenze certe che supportino una chiara ipotesi per l'origine di questa popolazione insulare ed è possibile solo supporre che, sebbene capace di lunghe dispersioni occasionali, la colonizzazione della Sardegna avvenuta attraverso la dispersione dei semi di *P. bifolia* var. *kuenkelei* possa essere stata agevolata da temporanee condizioni climatiche favorevoli sull'isola, che hanno prodotto habitat adatti alla germinazione di plantule e allo stabilirsi della popolazione. Infatti, a differenza di *P. algeriensis*, più comune sull'isola e più tipica di prati umidi in quota, *P. bifolia* var. *kuenkelei* ha oggi una distribuzione estremamente localizzata in Sardegna, essendo

presente soltanto in un bosco misto freddo ed ombreggiato che rappresenta un habitat molto insolito per questa isola mediterranea tipicamente xerica e nel quale, cosa interessante, non è presente *P. algeriensis*.

Attualmente, la Sardegna è caratterizzata dal tipico clima xerico mediterraneo che offre scarsissime opportunità di colonizzazione ai semi di una orchidea temperata come *Platanthera*. Ciononostante, durante l'ultimo picco glaciale, la Sardegna e il Nord Africa hanno agito da rifugi glaciali per molte specie arboree continentali che hanno beneficiato del clima temperato presente all'epoca attorno al bacino del Mediterraneo (Petit *et al.*, 2003 e bibliografia ivi contenuta). Quest'unica popolazione di *P. bifolia* var. *kuenkelei* della Sardegna può quindi rappresentare un membro isolato del gruppo *P. bifolia* stabilitosi lì probabilmente quando (durante l'ultima glaciazione) il tipico habitat boschivo, che caratterizza oggi la distribuzione continentale di *P. bifolia*, era ampiamente diffuso sull'isola offrendo migliori opportunità alla colonizzazione di questa orchidea. In alternativa, o anche in modo concomitante, l'affermazione di questa popolazione potrebbe aver beneficiato dei temporanei cambiamenti climatici non direttamente, ma invece indirettamente attraverso i benefici diretti goduti dai suoi simbionti micorrizici e impollinatori. La ridotta dimensione della popolazione di *P. bifolia* var. *kuenkelei* sull'isola potrebbe aver prodotto una diminuzione nella sua diversità genetica e influenzato negativamente la sua capacità di rispondere a cambiamenti futuri. Invece, confrontando il suo livello di ricchezza alplotipica con quello della più diffusa *P. algeriensis* insulare e con le altre popolazioni continentali, è evidente che questa popolazione mantiene ancora alti livelli di diversità genetica. Ciò potrebbe indicare una più grande dimensione della popolazione storica (o una sottostima dell'attuale) in *P. bifolia* var. *kuenkelei*, il che suggerirebbe che essa rappresenta una popolazione con una storia evolutiva relativamente lunga, come indicato anche dall'analisi di *mismatch*. Sebbene esuli dallo scopo di questo studio, la notevole differenza tra le due linee filetiche identificate in *P. bifolia* (Gruppi I e II in Fig. 1.2) e la

più stretta relazione della *P. bifolia* del centro Italia con le linee filetiche di *P. chlorantha/algeriensis* richiedono ulteriori indagini. Inoltre, la principale differenza morfologica tra *P. bifolia* e *P. chlorantha* risiede nel diverso posizionamento del viscidio. Ne consegue che, *P. bifolia* pone i suoi pollinodi lungo l'estensione della spiritromba della falena impollinatrice, mentre *P. chlorantha* fa aderire preferenzialmente i viscidii alla superficie dei suoi occhi (Maad & Nilsson, 2004). Di conseguenza, ogni ipotesi di una relazione più stretta tra alcune discendenze di *P. bifolia* e *P. chlorantha* deve implicare o una storia di frequenti scambi genici su scala locale, oppure che l'inversione del posizionamento dei viscidii potrebbe essere stata ricorrente (o reversibile) durante la cladogenesi di *Platanthera* (scenario ipotizzato in Bateman *et al.*, 2009). Poiché la linea filetica sardo-tunisina di *P. bifolia* var. *kuenkelei* è egualmente distante nel network aplo-tipico sia da *P. bifolia* che da *P. chlorantha/algeriensis*, ogni ipotesi di ordinamento cladistico rimane però dubbia. Pochissimi studi filogeografici si sono concentrati sulle principali rotte di colonizzazione della flora non autoctona del Quaternario dell'isola e sul contributo potenziale della dispersione di semi su lunga distanza. Ad esempio, l'evidenza di un aplo-tipo plastidiale di *Quercus suber* osservato in Tunisia ed Algeria, e presente anche in Sardegna, Corsica e in Provenza ha suggerito che un rifugio nordafricano possa aver contribuito alla ricolonizzazione di questa parte d'Europa dopo l'ultima glaciazione, attraverso il verificarsi di rari eventi naturali di LDD (Magri *et al.*, 2007). Sebbene il presente lavoro rappresenti uno dei primi tentativi di identificare *pattern* di relazioni filogeografiche tra le popolazioni di orchidee sarde e quelle della terraferma circostante, le poche evidenze dirette e indirette disponibili suggeriscono che simili *pattern* di colonizzazione dal Nord Africa possono essere stati percorsi anche da altre specie vegetali (orchidee incluse) che sono presenti sull'isola e che mostrano una distribuzione frammentata nel Mediterraneo occidentale. Ad esempio, uno studio filogeografico in corso indica una relazione molto stretta tra esemplari di *Ophrys fusca* s.l. sardi e tunisini (Stöckl *et al.*, 2007; J. Gogler, in prep.). Inoltre, un'analisi

filogeografica di *Anacamptis longicornu*, presente in Sardegna, Sicilia, isole Baleari e Africa settentrionale, ha rivelato analogamente un'antica storia di eventi di LDD tra questi territori attualmente isolati (Zitari *et al.*, in press). Tali nuove evidenze suggeriscono che diverse combinazioni di eventi LDD recenti e antichi possano aver contribuito significativamente a produrre l'unicità della flora sarda, e abbiano sicuramente fornito una parte consistente del background genetico all'elevata diversificazione delle specie di orchidee presenti su quest'isola.

2.4 Bibliografia

- Arditti J, Ghani AKA. 2000. Tansley review No. 110** – Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367–321.
- Bacchetta G, Iiriti G, Pontecorvo C. 2005.** Contributo alla conoscenza della flora vascolare endemica della Sardegna. *Informatore Botanico Italiano* 37: 306–307.
- Bateman RM, James KE, Luo YB, Lauri RK, Fulcher T, Cribb PJ, Chase MW. 2009.** Molecular phylogenetics and morphological reappraisal of the *Platanthera* clade (Orchidaceae: Orchidinae) prompts expansion of the generic limits of *Galearis* and *Platanthera*. *Annals of Botany* 104: 431–445.
- Camarda I. 1992.** Considerazioni sui rapporti tra la flora orofila della Sardegna e della Sicilia. *Plant Biosystems* 126: 145–157.
- Cardona MA, Contandriopoulos J. 1977.** L'endémisme dans les flores insulaires méditerranéennes. *Mediterranea* 2: 49–77.
- Cardona MA, Contandriopoulos J. 1979.** Endemism and evolution in the islands of the Western Mediterranean. In: Bramwell, D, ed. *Flora and Islands*. Academic Press London, 133–169.
- Clement M, Posada D, Crandall K. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Contandriopoulos J. 1990.** Spécificité de l'endémisme corse. *Atti dei Convegni Lincei* 85: 393–416.
- Delforge P. 2005.** *Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient*. Paris:Delachaux & Niestlé.

- Dixon CJ. 2006.** A means of estimating the completeness of haplotype sampling using the Stirling probability distribution. *Molecular Ecology Notes* 6: 650–652.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11–15.
- Ebert D, Peakall R. 2009.** A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of non coding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. *Molecular Ecology Resources* 9: 777–783.
- Excoffier L. 2004.** Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure 1 after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853–864.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** ARLEQUIN version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Frankham R. 1997.** Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311–327.
- Fu YX. 1997.** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Gamisan J, Jeanmonod D. 1995.** Le flore de Corse: Bilan des connaissances, intérêt patrimonial et état de conservation. *Ecologia Mediterranea* 21: 135–148.
- Gandawijaja D, Arditti J. 1983.** The orchids of Krakatau: evidence for a mode of transport. *Annals of Botany*, 52: 127–130.
- Gillespie RG, Roderick GK. 2002.** Arthropods on islands: colonization, speciation, and conservation. *Annual Review of Entomology* 47: 595–632.
- Grassi F, Minuto L, Casazza G, Labra M, Sala F. 2009.** Haplotype richness in refugial areas: phylogeographical structure of *Saxifraga callosa*. *Journal of Plant Research* 122: 377–387.

- Guzman B, Vargas P. 2009.** Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography* 36: 954–968.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hapeman, J. R. and K. Inoue. 1997.** Plant-pollinator interactions and floral radiation in *Platanthera* (Orchidaceae). Pp. 433-454 in *Molecular Evolution and Adaptive Radiation*, eds. T. J. Givnish and K. J. Sytsma. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Heck KL Jr, Van Belle G, Simberloff D. 1975.** Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56: 1459–1461.
- Heywood VH. 1995.** The Mediterranean flora in the context of world biodiversity. *Ecologia Mediterranea* 20: 11–18.
- Howe HF, Smallwood J. 1982.** Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 201–228.
- Hsü KJ, Ryan WBF, Cita MB. 1973.** Late Miocene desiccation of the Mediterranean. *Nature* 242: 240–244.
- Jacquemyn H, Brys R, Vandepitte K, Honnay O, Roldán-Ruiz I. 2006.** Fine-scale genetic structure of life history stages in the food-deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Molecular Ecology* 15: 2801–2808.
- Jersàková J, Malinova T. 2007.** Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237–241.
- Lieberman BS. 2000.** *Paleobiogeography*. New York: Plenum/Kluwer Academic.
- Lindberg H. 1942.** *En botanisk resa till Cypern 1939*.
- Lomolino MV, Sax DF, Riddle BR, Brown JH. 2006.** The island rule and a research agenda for studying ecogeographical patterns. *Journal of Biogeography* 33: 1503–1510.

- Maad J, Nilsson LA. 2004.** On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 83: 481–495.
- Machon N, Bardin P, Mazer SJ, Moret J, Godelle B, Austerlitz F. 2003.** Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytologist* 157: 677–687.
- Magri D, Fineschi S, Bellarosa R, Buonamici A, Sebastiani F, Schirone B, Simeone MC, Vendramin GG. 2007.** The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16: 5259–5266.
- Mansion G, Rosenbaum G, Schoenenberger N, Bacchetta G, Rossello JA, Conti E. 2008.** Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family *Araceae*. *Systematic Biology* 57: 269–285.
- Mansion G, Selvi F, Guggisberg A, Conti E. 2009.** Origin of Mediterranean insular endemics in the Boraginales: integrative evidence from molecular dating and ancestral area reconstruction. *Journal of Biogeography* 36: 1282–1296.
- Médail F, Quézel P. 1997.** Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112–127.
- Micheneau C, Carlswald BS, Fay MF, Bytebier B, Paillet T, Chase MW. 2008.** Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandaeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 908–922.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Nathan R. 2006.** Long-distance dispersal of Plants. *Science* 313: 786–788.

- Nathan R, Katul GG, Horn HS, Thomas SM, Oren R, Avissar R, Pacala SW, Levin SA. 2002.** Mechanisms of long-distance dispersal of seeds by wind. *Nature* 418: 409–413.
- Nathan R, Schurr FM, Orr Spiegel O, Steinitz O, Trakhtenbrot A, Tsoar A. 2008.** Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Science* 313: 786–788.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palmé A, Martín JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003.** Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. 1998.** Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844–855.
- Ramakrishnan AP, Musial T, Cruzan MB. 2010.** Shifting dispersal modes at an expanding species' range margin. *Molecular Ecology* 19: 1134–1146.
- Reichenbach HGL. 1929.** *Iconographia botanica exotica*.
- Richard LCM. 1817.** *De Orchideis Europaeis Annotationes*.
- Rogers AR, Harpending H. 1992.** Population-growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569.
- Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C. 2002.** Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *Journal of the Virtual Explorer* 8: 107–130.
- Salvo G, Bacchetta G, Ghahremaninejad F, Conti E. 2008.** Phylogenetic relationships of *Ruteae* (Rutaceae): new evidence from the chloroplast genome and comparisons with non-molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 736–748.

- Scrugli A, Cogoni A. 1990.** *Platanthera algeriensis* Battandier et Trabut (Orchidaceae), specie nuova per la flora italiana. *Webbia* 44: 307–314.
- Scrugli A, Grasso MP. 1981.** Il genere *Platanthera* LCM Richard (Orchidaceae) in Sardegna. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali Memorie serie B* 88: 1–9.
- Scrugli A, Sotgiu F, Solinas G, Cogoni A. 2007.** Eccezionale ritrovamento in Sardegna di *Platanthera bifolia* (L.) L.C.M Richard (Orchidaceae). *Caesiana* 5: 7–12.
- Stökl J, Twele R, Erdmann DH, Francke W, Ayasse M. 2007.** 1 Comparison of the flower scent of the sexually deceptive orchid *Ophrys iricolor* and the female sex pheromone of its pollinator *Andrena morio*. *Chemoecology* 17: 231–233.
- Trabut LC. 1905.** *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie.*
- Tranchida-Lombardo V, Roy M, Bugot E, Santoro G, Selosse MA, Cozzolino S. 2010.** Spatial repartition and genetic relationship of green and albino individuals in mixed populations of *Cephalanthera* orchids. *Plant Biology* 12: 659–667.
- Willson MF, Traveset A. 2000.** The ecology of seed dispersal. In: M. Fenner ed. *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. 2nd edn. Wallingford: CAB International, 85–110.
- Zitari A, Tranchida-Lombardo V, Cafasso D, Helal AN, Scopece G, Cozzolino S. 2011 (in press).** The disjointed distribution of *Anacamptis longicornu* in the West-Mediterranean: The role of vicariance versus long-distance seed dispersal. *Taxon*.

Capitolo 3

Genesi e caratterizzazione dell'endemismo siciliano *Neotinea commutata* (Tod.) R. M. Bateman

3.1 Introduzione

La genesi di nuove specie, intesa nell'ambito della definizione biologica del concetto di specie (Mayr, 1942), è subordinata all'insorgenza di qualche forma di isolamento riproduttivo tra gruppi di individui originariamente appartenenti alla stessa specie. In passato, l'isolamento riproduttivo si riteneva generato principalmente dall'insorgenza di barriere geografiche (Mayr, 2000) anche se, in tempi più recenti, si tende invece ad attribuire un ruolo sempre più importante all'effetto della selezione naturale divergente (Gavrilets, 2003; Coyne & Orr, 2004) che opera sulla base di differenze ecologiche tra gruppi di individui, indipendentemente dalla sussistenza di barriere fisiche che possano separarli.

Le isole e gli arcipelaghi, per la loro condizione intrinseca di isolati geografici, hanno da sempre rappresentato dei modelli di elezione per testare la speciazione (Darwin, 1859; Wallace, 1880; MacArthur & Wilson, 1967; Carlquist, 1974) e, nonostante la preminenza attribuita oggi alla selezione divergente rispetto all'isolamento geografico, gli ecosistemi insulari continuano ancora a rivestire un ruolo di primaria importanza per questi studi. Rispetto alle popolazioni presenti sugli ampi territori continentali, le popolazioni che colonizzano le isole si ritrovano comunque a vivere in contesti ecologici spesso differenti e la selezione potrà operare su di loro in maniera divergente rispetto alle popolazioni sulla terra ferma, dando luogo tendenzialmente ad organismi con adattamenti specifici e localizzati. Tali processi sono alla base dei fenomeni di insularità e vengono invocati per spiegare la frequente alta percentuale di endemismi che caratterizza la flora e la fauna insulari, come accade ad esempio per le isole del bacino del Mediterraneo (Médail & Quézel, 1997). I fattori coinvolti nella genesi di specie endemiche sono molteplici e spesso sinergici, come le barriere geografiche alla dispersione, le variazioni climatiche e fattori genetici come l'ibridazione, la poliploidia e

l'evoluzione dei sistemi riproduttivi (Thompson, 2005). Per questo motivo, tra le varie definizioni e caratterizzazioni assegnate al termine endemismo (vedi Kruckeberg & Rabinowitz, 1985), la più utile allo studio del fenomeno è quella di Major (1988), secondo cui un endemismo è un *taxon* confinato in una particolare area per cause storiche, ecologiche o fisiologiche. Tale definizione non implica però che l'isolamento riproduttivo costituisca una condizione necessaria alla genesi di un endemismo e quindi non necessariamente, dal punto di vista biologico, tutti i taxa endemici debbano essere considerati delle specie biologiche. In questo contesto, quelle entità endemiche in cui oltre all'isolamento spaziale e all'adattamento ecologico si riconosca anche un isolamento riproduttivo meritano quindi un'attenzione particolare nelle ricerche sulla speciazione.

La flora del bacino del Mediterraneo, per effetto della complessa storia geologica dell'area e le recenti fluttuazioni climatiche, è caratterizzata da una combinazione di neo-endemismi, in parte prodotti dalla recente diversificazione avvenuta durante il Quaternario, e di paleo-endemismi, con le loro distribuzioni relittuali (Gillespie & Roderick, 2002; Lomolino *et al.* 2006), effetto della conservazione per lungo tempo della loro originale distribuzione del Terziario (Kadereit *et. al.*, 2004; Thompson, 2005). La distinzione più importante tra le due categorie consiste nel fatto che i neo-endemismi permettono di stabilire le relazioni genetiche e filogenetiche tra i *sister taxa* e le loro distribuzioni, mentre i paleo-endemismi, isolati probabilmente dall'estinzione di antenatori e specie affini, hanno distribuzioni attuali che possono non corrispondere ai loro siti di divergenza per motivi tettonici di antica data. Le specie neo-endemiche offrono quindi sistemi modello più adatti allo studio della differenziazione in relazione alla storia recente e a fenomeni di selezione ancora in atto (Thompson, 2005).

Le percentuali di specie endemiche in particolari aree del Mediterraneo sono spesso superiori al 10%, potendo arrivare su scala locale anche al 20% (Greuter, 1991; Médail & Quézel, 1997). In particolare, i territori delle isole maggiori del Mediterraneo (Sicilia, Sardegna, Corsica, Cipro e Baleari) fanno registrare i valori più alti di

percentuale di endemismi (Médail & Quézel, 1997) e di diversità di specie (Lobo *et al.*, 2001). Inoltre, data la vicinanza stretta delle isole tra loro e con i territori continentali, i neoendemismi non hanno subito l'isolamento geografico estremo tipico di popolazioni neo-endemiche delle isole oceaniche e spesso sono stati esposti a contatti secondari con le specie/popolazioni affini presenti sulla terraferma, rendendo ancor più necessaria la presenza di barriere riproduttive che impediscano il loro rimescolamento con le popolazioni originarie. Accanto quindi a fenomeni di adattamento locale, la sopravvivenza di una specie endemica nel mediterraneo è legata a concomitanti fenomeni di modificazioni genetiche o cromosomiche che possano garantirne nel tempo l'integrità biologica.

Tra le modificazioni più significative per l'insorgenza dell'isolamento riproduttivo vi sono quelle dovute ad eventi di poliploidia (Riesenberg & Willis, 2007; Wood *et al.*, 2009). La duplicazione dell'intero genoma infatti crea forti barriere riproduttive con le popolazioni originarie con le quali, spesso secondariamente, il neo-endemismo può venire in contatto a seguito delle frequenti variazioni paleoclimatiche che si sono susseguite anche in tempi recenti nella storia del mediterraneo. Nel caso quindi di poliploidi a distribuzione endemica insulare, è importante riuscire a definire i contributi relativi dell'isolamento geografico, dato dall'insularità da un lato, e dell'isolamento riproduttivo, prodotto dalla poliploidia dall'altro.

A questo proposito, numerosi studi su complessi di poliploidi dimostrano che essi sono estremamente più dinamici di quanto si credesse (Thompson & Lumaret, 1992; Soltis and Soltis, 1993) e che sono dotati, in genere, di livelli più alti di diversità genetica rispetto ai diploidi di origine (Hedren, 2001; Thompson, 2005). Soprattutto nel caso degli allopoliploidi, i contributi dei due genomi parentali diversi e l'aumentata eterozigosità che ne consegue, favoriscono spesso la comparsa di caratteri adattativi che consentono l'affermazione dell'unità riproduttiva in nuove nicchie ecologiche rispetto ai parentali (Grant, 1981). Alcuni studi indicano inoltre che il flusso genico e le

introgresioni possono verificarsi tra individui caratterizzati da diversi livelli di ploidia (Lord & Richards, 1977; Brochmann *et al.*, 1992; Menken *et al.*, 1995), ampliando ulteriormente le potenzialità dei taxa poliploidi. Infine, la riorganizzazione dei genomi ibridi negli allopoliploidi può produrre combinazioni dei caratteri parentali dotati di valore adattativo che ne promuovono l'evoluzione indipendente dai *taxa* parentali. Recenti studi (Paun *et al.*, 2010) sui complessi poliploidi in generi di orchidee mediterranee come *Dactylorhiza* (Hedrén, 1996a; 1996b; 1996c), dimostrano quanto siano determinanti sui meccanismi adattativi nei poliploidi gli effetti epigenetici che riorganizzano il genoma e il trascrittoma subito dopo la sua duplicazione (Chen, 2007; Paun *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2008) e che si traducono spesso in forme di adattamento localizzato, indotto da selezione.

Le condizioni ecologiche locali, che differenziano i territori insulari da quelli continentali, possono, in questo senso, offrire nuove opportunità per organismi dotati di livelli di diversità genetica più elevati, come appunto quelli poliploidi (Hedren, 2001; Thompson, 2005), che risulterebbero selettivamente favoriti nello sfruttamento delle risorse insulari rispetto alle popolazioni diploidi di origine.

La complessità biologica delle orchidee rende le popolazioni insulari dei modelli di studio ideali per valutare i processi di genesi dei neo-endemismi e i fattori che ne determinano l'integrità biologica nel tempo. Molte sono, infatti, le evidenze nelle orchidee, come nei generi *Dactylorhiza* e *Serapias*, di fenomeni di ibridazione ricorrente e poliploidizzazione (Hedrén, 1996a; Hedrén *et al.*, 2001, 2008; Pillon *et al.*, 2007).

In particolare, *Neotinea commutata* (Tod.) R.M. Bateman, variante endemica siciliana della più comune *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman ad ampia distribuzione continentale, può rappresentare un eccellente modello di studio di specie insulare isolata ma geograficamente molto vicina all'ampio areale della specie parentale. Descritta per la prima volta nel 1842 dal botanico siciliano Agostino Todaro, con il nome di *Orchis commutata*, questa orchidea fu declassata al rango di sottospecie nel 1882

come *Orchis tridentata* Scopoli subsp. *commutata* (Tod) Nyman, per la pressoché completa somiglianza morfologica con la specie parentale ad ampia distribuzione. Più recentemente però la scoperta dello status poliploide che la caratterizza (Mazzola, 1984), rispetto alla specie diploide dalla quale sembrerebbe originarsi (*N. tridentata*), spiegherebbe l'isolamento riproduttivo dell'entità siciliana ed il suo status di specie endemica.

Nel presente lavoro si è quindi cercato di caratterizzare tale endemismo siciliano per indagare i meccanismi responsabili della sua genesi e della sua potenziale diversificazione dalla specie parentale *N. tridentata*, ad ampia distribuzione. In particolare, ci si è chiesti: *N. commutata* è sempre effettivamente un poliploide? E se lo è, si tratta di un autopoliploide o di un allopoliploide, frutto dell'azione congiunta di ibridazione e duplicazione genomica? Ed ancora, costituisce un insieme eterogeneo composto da diversi livelli di ploidia? Sull'isola, essa coesiste con la specie parentale *N. tridentata*? Esistono barriere riproduttive con quest'ultima e con l'affine *N. lactea*?

3.2 Risultati

3.2.1 Distribuzione dei *taxa*

L'analisi della distribuzione dei *taxa* ha permesso di identificare e censire stazioni di *N. commutata*, *N. lactea* e *N. tridentata*, in un areale comprendente la penisola italiana meridionale, Sicilia e Sardegna. Il territorio siciliano ospita popolazioni di *N. commutata* e *N. lactea* ampiamente distribuite, in simpatria. Simili condizioni di prossimità sono state riscontrate anche tra le popolazioni campane di *N. tridentata* e *N. lactea* (Fig. 3.1; Tab. 3.1). In particolare, per la regione etnea, il versante nord-orientale del vulcano ospita popolazioni di *N. commutata* e di *N. lactea*, mentre nelle stazioni di *N. commutata* identificate nel versante sud-orientale (NCARD, NCETN), non è stata evidenziata presenza di individui di *N. lactea* (Fig. 3.2).

Le differenze fenologiche note per le specie in esame (Del Forge, 2005) sono state confermate, verificando che la fioritura in *N. commutata* e *N. tridentata* (aprile – maggio) avviene con circa un mese di ritardo rispetto a *N. lactea* (marzo – aprile). Ciononostante, nelle stazioni di simpatria, è stata riscontrata una sovrapposizione tra la fase finale di fioritura di *N. lactea* e l'inizio della fioritura in *N. commutata* e *N. tridentata* (Tab. 3.1).

Campionamento												
Specie	Codice popolazione	N. di Individui	Località	Coordinate Geografiche	Anno	Raccoglitori	Analisi genetiche ITS1	Analisi genetiche cpDNA	Analisi morfometriche	Analisi citologiche	Analisi citometriche	Test di incrocio interspecifico
Neotinea commutata	NCCAL	30	Calatabiano (CT)	37° 49' 40.57" N - 15° 13' 30.51" E	2006	V. Tranchida Lombardo		x	0			
	NCCES	5	Cesarò (ME)	37° 50' 44.99" N - 14° 45' 14.98" E	2006	V. Tranchida Lombardo	x	x	0			
	NCBUC	15	Buccheri (SR)	37° 06' 55.98" N - 14° 51' 57.70" E	2006	V. Tranchida Lombardo		x	0			
	NCSVC	1	Macari - S. Vito lo Capo (TP)	38° 06' 27" N - 12° 40' 24" E	2009	R. Lorenz			1	x		
	NCFAV	48	Favignana (TP)	37° 56' 25" N - 12° 18' 22" E	2009	R. Lorenz	x	x	4	x		
	NCLEV	22	Levanzo (TP)	30° 01' 05" N - 12° 20' 03" E	2009	R. Lorenz		x	0	x		
	NCFRA	40	Cant.ra Cozzo Schisina - Francavilla di Sicilia (ME)	37° 56' 34" N - 15° 07' 26" E	2009/2010/2011	A. Cristaudo - R. Galesi	x	x	31	x		
	NCAID	21	Aidone (EN)	37° 24' 16.42" N - 14° 26' 5.41" E	2009	A. Cristaudo - R. Galesi	x	x	19	x		
	NCSAP	17	Sauci Piccolo - San Vito lo Capo (TP)	38° 10' 30" N - 12° 45' 50" E	2010	V. Tranchida Lombardo - G. Scopece	x	x	16	x	x	x
	NCBAG	33	M.te Catalano - Bagheria (PA)	38° 03' 09.7" N - 13° 27' 16.8" E	2010	V. Tranchida Lombardo - G. Scopece	x	x	26	x	x	x
	NCNOV	22	Montalbano Elicona (ME)	37° 58' 05.8" N - 15° 00' 21.6" E	2010	G. Pavarese	x	x	0	x	x	
	NCETN	29	C.da San Leo - Belpasso (CT)	37° 38' 45.5" N - 14° 59' 16.1" E	2010	G. Pavarese - R. Galesi	x	x	5	x	x	x
	NCPCL	47	Montalbano Elicona (ME)	37° 59' 05.4" N - 15° 01' 54.8" E	2009/2010	G. Pavarese	x	x	17	x	x	x
	NCMCA	26	M.te Calciniera - Linguaglossa (CT)	37° 50' 45.19" N - 15° 09' 32.72" E	2011	G. Pavarese - A. Cristaudo		x	21	x		
	NCTAO	2	M.te Veneretta - Taormina (ME)	37° 52' 06.34" N - 15° 15' 11.50" E	2011	G. Pavarese		x	2			
NCADR	30	C.da Calcerana - Adrano (CT)	37° 41' 38.61" N - 14° 53' 43.07" E	2011	G. Pavarese - A. Cristaudo		x	28		x		
NCCAS	6	M.te Colla - Castiglione di Sicilia (CT)	37° 52' 29.20" N - 15° 07' 9.00" E	2011	G. Pavarese - A. Cristaudo		x	6		x		
Totale degli esemplari di N. commutata		394										
Neotinea lactea	NLCIL_S	3	Monte S. Giacomo (SA) - Campania	40° 23' 18.57" N - 15° 27' 39.07" E	2007	G. Scopece		x	0			
	NLTAO	47	M.te Veneretta - Taormina (ME) - Sicilia	37° 52' 06" N - 15° 15' 58" E	2009	G. Pavarese - H. Breitkopf		x	7		x	x
	NLPOL	6	Montalbano Elicona (ME) - Sicilia	37° 58' 05.8" N - 15° 00' 21.6" E	2010	G. Pavarese	x		0			
	NLNNOV	18	Cant.ra Cozzo Schisina - Francavilla di Sicilia (ME)	37° 56' 27" N - 15° 07' 50" E	2010	G. Pavarese	x	x	0			
	NLPEL	25	Cant.ra Cozzo Schisina - Francavilla di Sicilia (ME)	37° 56' 28.28" N - 15° 7' 47.63" E	2011	G. Pavarese - A. Cristaudo			3		x	x
	NLSTE	35	San Teodoro - Cesarò (ME) - Sicilia	37° 50' 58.11" N - 14° 38' 52.22" E	2011	G. Pavarese		x	7		x	x
	NLCOL	32	M.te Colla - Castiglione di Sicilia (CT) - Sicilia	37° 52' 29.20" N - 15° 7' 9.00" E	2011	G. Pavarese - A. Cristaudo			4		x	
	NLCAS	27	M.te Colla - Castiglione di Sicilia (CT) - Sicilia	37° 52' 27.81" N - 15° 7' 13.06" E	2011	A. Cristaudo			22			x
	NLBOS	7	Bosa - Oristano - Sardegna	~ 40° 18' 13" N - 8° 29' 58.37" E	2011	S. Cozzolino		x	6			x
NLTEG	7	Teggiano (SA) - Campania	40° 23' 18.57" N - 15° 27' 39.07" E	2011	V. Tranchida - G. Scopece		x	7		x	x	
Totale degli esemplari di N. lactea		207										
Neotinea tridentata	NTPIEM	16	Località non specificata - Piemonte	/	2007	/		x	0	x		
	NTSAS_S	3	Monte S. Giacomo (SA) - Campania	40° 19' 54.74" N - 15° 30' 29.71" E	2007	G. Scopece		x	0			
	NTSOR	1	Loc. Nocelle - P. ositano (SA) - Campania	40° 37' 17.99" N - 14° 31' 10.94" E	2010	H. Breitkopf		x	0			
	NTFAI	6	M.te Falto - Castellammare di Stabia (NA) - Campania	40° 39' 43.06" N - 14° 29' 38.97" E	2010	G. Scopece - H. Breitkopf		x	0			
	NTSAS	42	Monte S. Giacomo (SA) - Campania	40° 19' 54.74" N - 15° 30' 29.71" E	2010	G. Scopece - H. Breitkopf		x	15		x	x
	NTRIP	18	Monte Sant'Angelo (FG) - Puglia	41° 42' 16" N - 15° 56' 37" E	2011	G. Scopece - V. Tranchida Lombardo		x	17		x	
	NTASP	36	Piano dello Zillastro - Zervò (RC) - Calabria	38° 15' 04,9" N - 16° 01' 37,9" E	2011	G. Pavarese		x	29		x	x
Totale degli esemplari di N. tridentata		122										
Totale degli esemplari dcampionati		723										

Tabella 3.1. Stazioni di campionamento e campioni esaminati. Il campionamento degli esemplari è stato effettuato negli anni compresi tra il 2006 ed il 2011, nei mesi di marzo, aprile, maggio e giugno, in base ai periodi di fioritura delle specie e delle popolazioni. Sono stati campionati tessuti fogliari da 723 individui, identificati rispettivamente in 17 stazioni di *N. commutata* (394 esemplari), 10 di *N. lactea* (207 esemplari) e 7 di *N. tridentata* (122 esemplari). Laddove consentito dalle condizioni dell'individuo, sono stati altresì raccolti separatamente e opportunamente conservati campioni di elementi fiorali per le analisi morfologiche (labello), citometriche (pollinodi) e cromosomiche (ovari). Da alcune popolazioni sono stati prelevati, inoltre, anche se in numero esiguo, degli individui per effettuare incroci interspecifici, in condizioni comuni.

3.2.2 Analisi morfometriche

Nessuna differenza statisticamente significativa nelle posizioni relative dei 24 *landmarks* utilizzati (Fig. 3.3 - A, C, E) è stata riscontrata nei profili dei labelli, né nelle dimensioni degli speroni, tra le tre specie. Basandosi sulle componenti principali (PCA) della deviazione di ogni campione (*Weight scores*) dalla configurazione media (*consensus*) di ogni specie (Fig. 3.3 - B, D, F), la combinazione delle due componenti principali più informativa spiega il 24,3% della variabilità complessiva. Questa combinazione ha prodotto una distribuzione omogenea e sovrapposta dei punti campionari di ogni specie, senza significativi scostamenti che distinguano le specie tra loro (Fig. 3.4). Cionondimeno, una deviazione, sebbene non significativa, sembra caratterizzare la nuvola di punti relativa ai campioni di *N. lactea*, rispetto alle altre due specie.

Questa lieve disomogeneità è attribuibile presumibilmente alle dimensioni medie dei fiori, ma non alla forma complessiva del margine del fiore. Parimenti, sebbene in modo meno marcato, è identificabile uno scostamento dei campioni di *N. commutata* che appaiono tendenzialmente di dimensioni maggiori di quelli di *N. tridentata*. In sintesi, l'insieme labello-sperone in *N. commutata* non è morfologicamente intermedio tra *N. lactea* e *N. tridentata*, ma al contrario di dimensioni lievemente superiori a quest'ultima, sebbene in termini statisticamente non significativi.

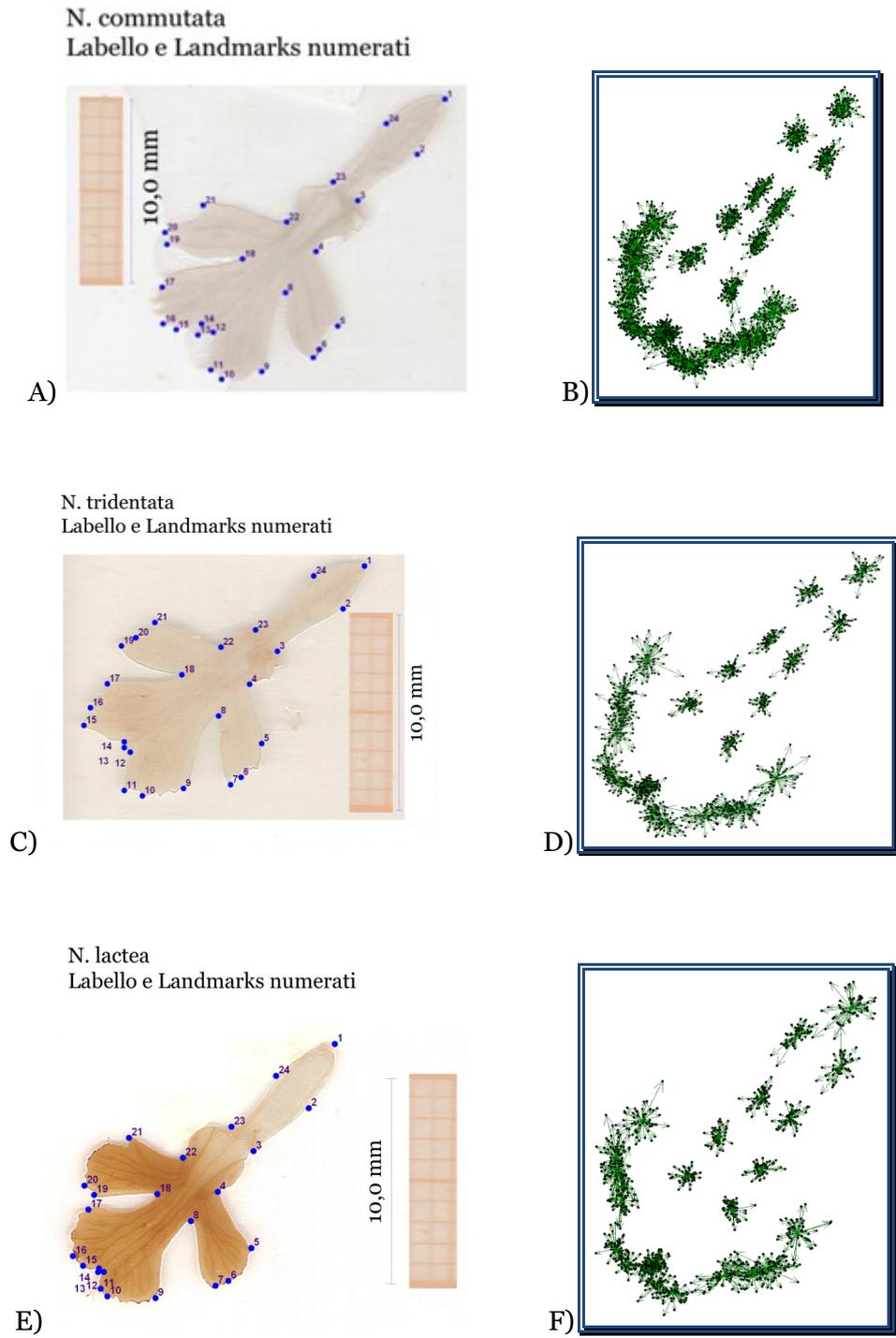


Figura 3.3. Landmark su labello di *N. commutata* (A), *N. tridentata* (C), *N. lactea* (E). In B, D, F le distribuzioni dei Landmark tra i campioni esaminati (quadrati neri) e le deviazioni dalla distribuzione media (vettori verdi).

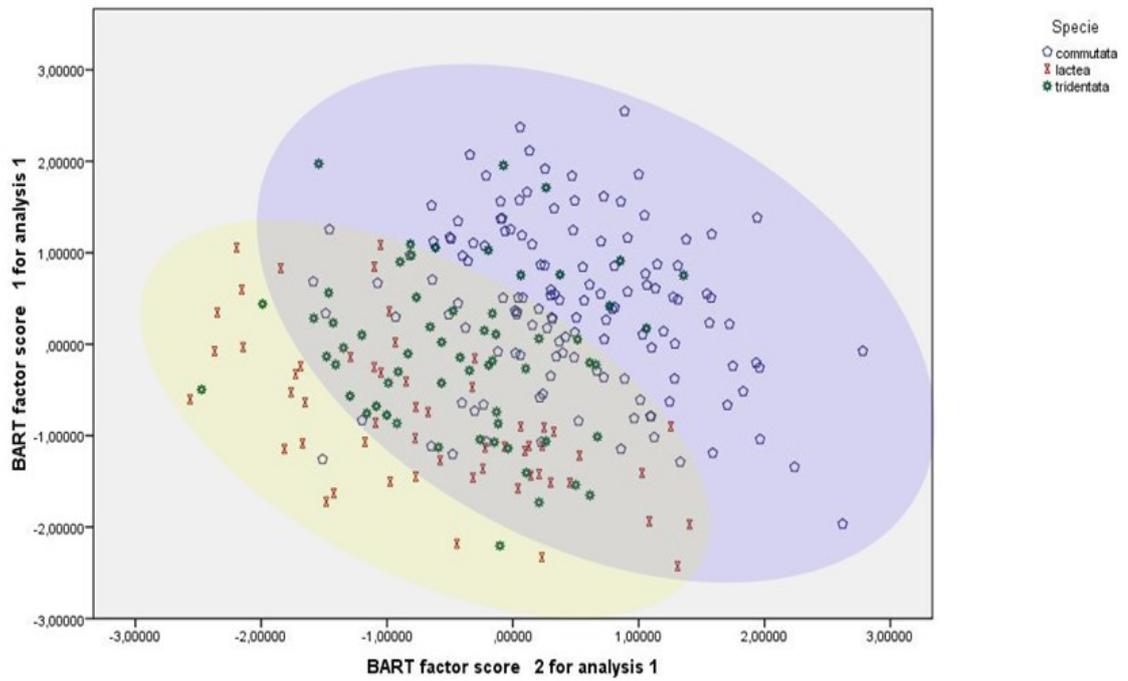


Figura 3.4. PCA su campioni di *N. commutata*, *N. tridentata* e *N. lactea*. Le prime due componenti spiegano il 24,3% della variabilità complessiva.

3.2.3 Analisi del DNA plastidiale

Le analisi di sequenziamento del locus plastidiale *ycf4-cemA*, mediante primer ANU_cp075-L e ANU_cp076-R (Ebert & Peakall, 2009), hanno evidenziato una delezione di 19 bp negli aplotipi di *N. lactea* e *N. commutata*, rispetto all'omologa regione in *N. tridentata* (Fig. 3.5). L'amplificazione del locus con primer interni *O_com-F* e *O_com-R* e la successiva elettroforesi in gel d'agarosio sono state effettuate, con esito positivo, su 15 campioni per popolazione, selezionati rispettivamente da 15 popolazioni di *N. commutata*, 4 di *N. lactea* e 7 di *N. tridentata* (Tab. 3.1). Il 100% dei campioni di *N. commutata* analizzati risulta caratterizzato dalla delezione così come tutti i campioni di *N. lactea*; mentre tutti i campioni di *N. tridentata*, di tutti i distretti geografici dell'areale di distribuzione campionati, risultano privi di tale delezione (Fig. 3.6).

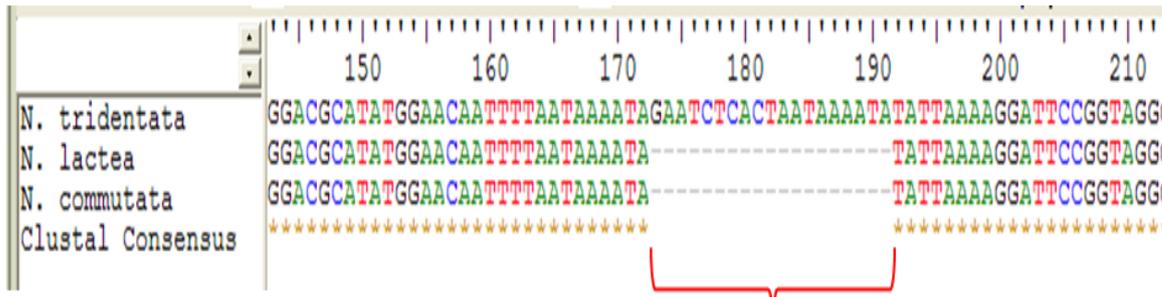


Figura 3.5. Allineamento parziale delle sequenze nucleotidiche della regione di DNA plastidiale *ycf4-cemA*. In evidenza, la delezione che distingue *N. lactea* e *N. commutata* da *N. tridentata*.

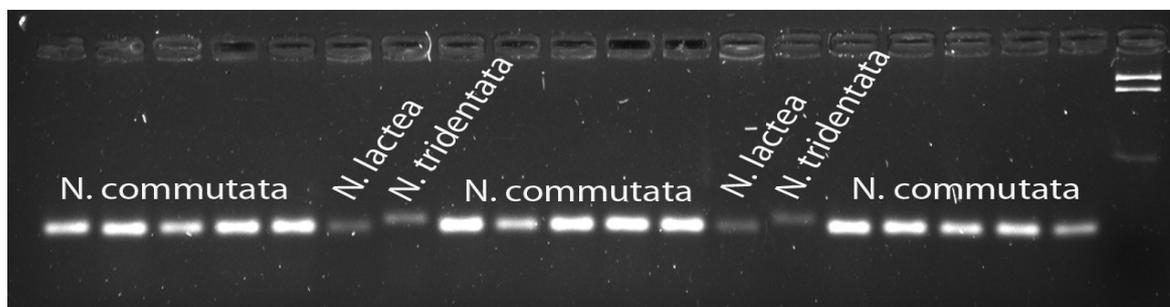


Figura 3.6. Pattern elettroforetico su gel d'agarosio degli amplificati del locus *ycf4-cemA*. *N. commutata* produce frammenti identici a quelli di *N. lactea*, e distinti da *N. tridentata*.

3.2.4 Analisi del DNA nucleare

Il sequenziamento della regione di DNA ribosomale ITS1 (Internal transcribed spacer 1), ha evidenziato complessivamente 4 ribotipi: 2 in omozigosi, rispettivamente in *N. tridentata* e *N. lactea* (conformi a quelli già pubblicati con GenBank accession: HQ657132 e Z94081) e 4 in *N. commutata*, comprensivi dei ribotipi di *N. tridentata* e *N. lactea*. Dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche, sono stati rilevati 8 siti variabili per sostituzione di singolo nucleotide tra *N. tridentata* e *N. lactea*, che differenziano invariabilmente i campioni delle due specie (Tab. 3.2).

La medesima analisi condotta su 66 individui di *N. commutata*, provenienti da 11 popolazioni censite, ha identificato 3 ribotipi in percentuali significative (Tab. 3.2): il 69,7% dei campioni presenta ribotipo omozigote di *N. tridentata* (ribotipo A), il 13,6% ribotipo di *N. tridentata* e *N. lactea* in eterozigosi in tutte le posizioni che li distinguono (ribotipo B) e il 4,6% ribotipo omozigote di *N. tridentata* con eterozigosi in una base che non differisce tra *N. tridentata* e *N. lactea* (ribotipo C). Un solo individuo della popolazione etnea ha espresso un ribotipo omozigote di *N. lactea* (1,5%) (ribotipo D). In una percentuale minore di campioni (complessivamente il 10,6%) si ritrovano ribotipi in cui i siti in eterozigosi compaiono occasionalmente in omozigosi. Più della metà di questi esprimono in omozigosi la base che ritroviamo in *N. tridentata*.

Ribotipi ITS1 in <i>N. commutata</i> , <i>N. tridentata</i> , <i>N. lactea</i>			Posizioni dei siti variabili								
Specie	Campioni	Frequenza	45	80	88	98	102	122	157	187	213
<i>N. commutata</i> (A) - Ribotipo <i>N. tridentata</i> in omozigosi	46	69,70%	-C-	-T-	-G-	-C-	-G-	-A-	-G-	-C-	-G-
<i>N. commutata</i> (B)	9	13,64%	-M-	-Y-	-R-	-Y-	-R-	-R-	-G-	-Y-	-R-
<i>N. commutata</i> (C)	3	4,55%	-C-	-T-	-G-	-C-	-G-	-A-	-R-	-C-	-G-
<i>N. commutata</i> (D) - Ribotipo <i>N. lactea</i> in omozigosi	1	1,52%	-A-	-C-	-A-	-T-	-A-	-G-	-G-	-A-	-A-
<i>N. commutata</i> - Ribotipi con eterozigosi parziale	7 (*)										
<i>N. tridentata</i>			-C-	-T-	-G-	-C-	-G-	-A-	-G-	-C-	-G-
<i>N. lactea</i>			-A-	-C-	-A-	-T-	-A-	-G-	-G-	-A-	-A-

Tabella 3.2. Ribotipi identificati in *N. commutata*, *N. tridentata* e *N. lactea*. (*) Ciascuno dei 7 campioni esaminati mostra aplotipo unico diverso dagli altri per un'unica sostituzione.

3.2.5 Analisi del cariotipo

L'analisi delle piastre metafasiche di ovario, in microscopia ottica, con colorazione Fuelgen, è stata effettuata su 73 individui di *N. commutata*, da 10 popolazioni, e 2 individui di *N. tridentata*, da una popolazione.

Tutti i campioni di *N. commutata* analizzati posseggono corredo cromosomico tetraploide ($4n=84$) (Fig. 3.7a), mentre i due individui di *N. tridentata* hanno corredo diploide ($2n=42$) (Fig. 3.7b).

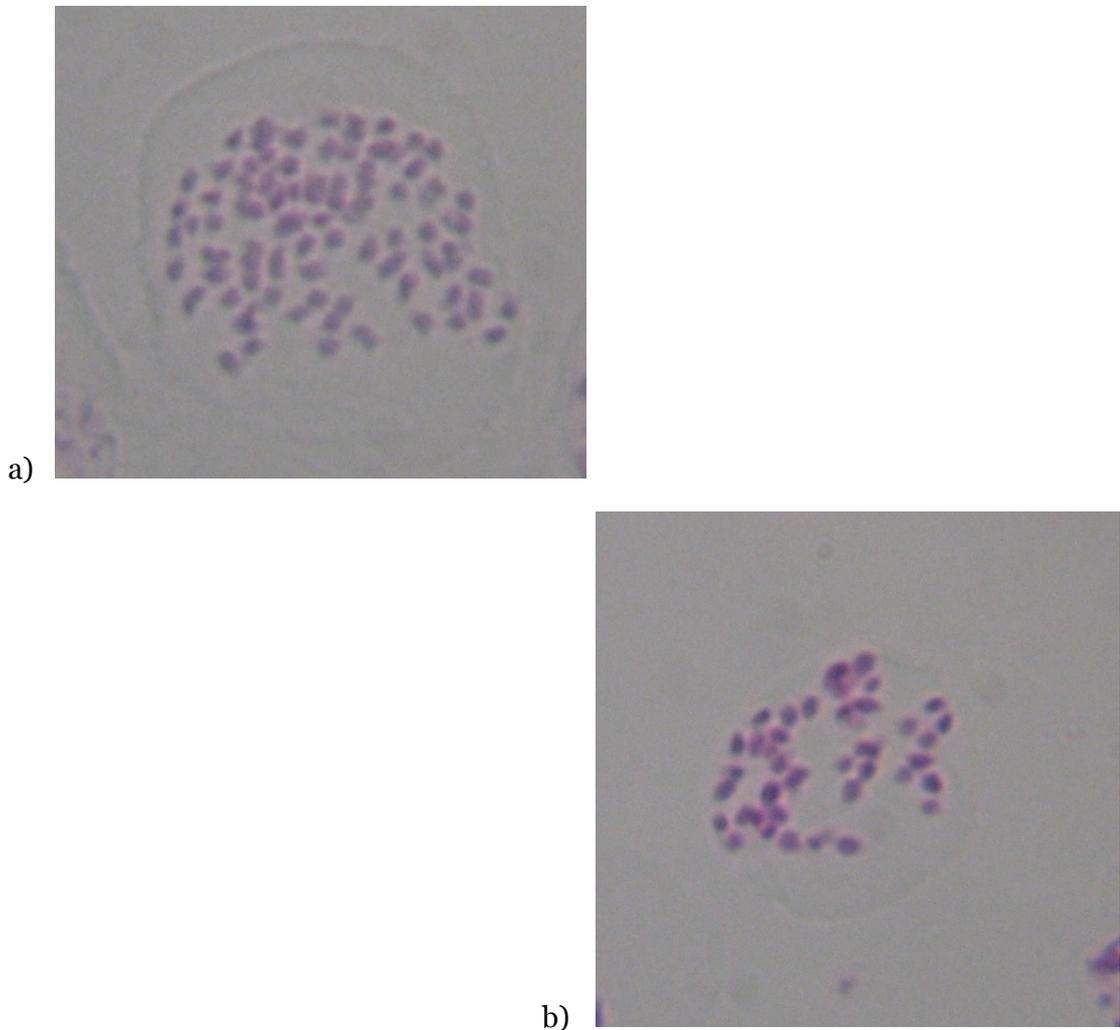


Figura 3.7. Confronto tra piastra metafase tetraploide ($4n=84$) di *N. commutata* (a) e diploide ($2n=42$) di *N. tridentata* (b).

I cromosomi appaiono di dimensioni omogenee e di forma circolare in entrambe le specie e la morfologia generale dei cromosomi di *N. commutata* non sembra differire sostanzialmente da quella di *N. tridentata*.

Le piastre metafasiche di *N. commutata*, identificate allo stadio di zigotene in profase I (Fig. 3.8), mostrano appaiamento con formazioni di bivalenti, composti da coppie di cromosomi in appaiamento. In nessun campione esaminato è stata riscontrata la presenza di formazioni tetraivalenti in zigotene, ovvero di appaiamento cromosomico simultaneo di quattro cromosomi omologhi.

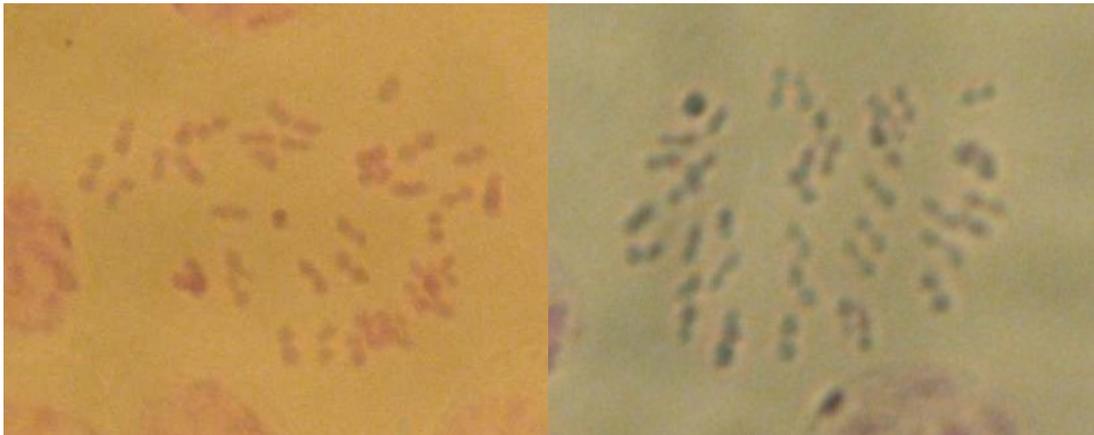


Figura. 3.8. Formazione di bivalenti, allo stadio di zigotene in profase I.

3.2.6 Analisi del contenuto nucleare di DNA

L'esame in citometria di flusso del contenuto 1-C di DNA, in nuclei isolati da polline, ha fornito valori omogenei all'interno delle singole popolazioni. L'analisi di *N. tridentata* (12 individui), *N. commutata* (33 individui), *N. lactea* (30 individui) ha evidenziato valori medi ben distinti tra le tre specie (Fig. 3.9, Tab. 3.3).

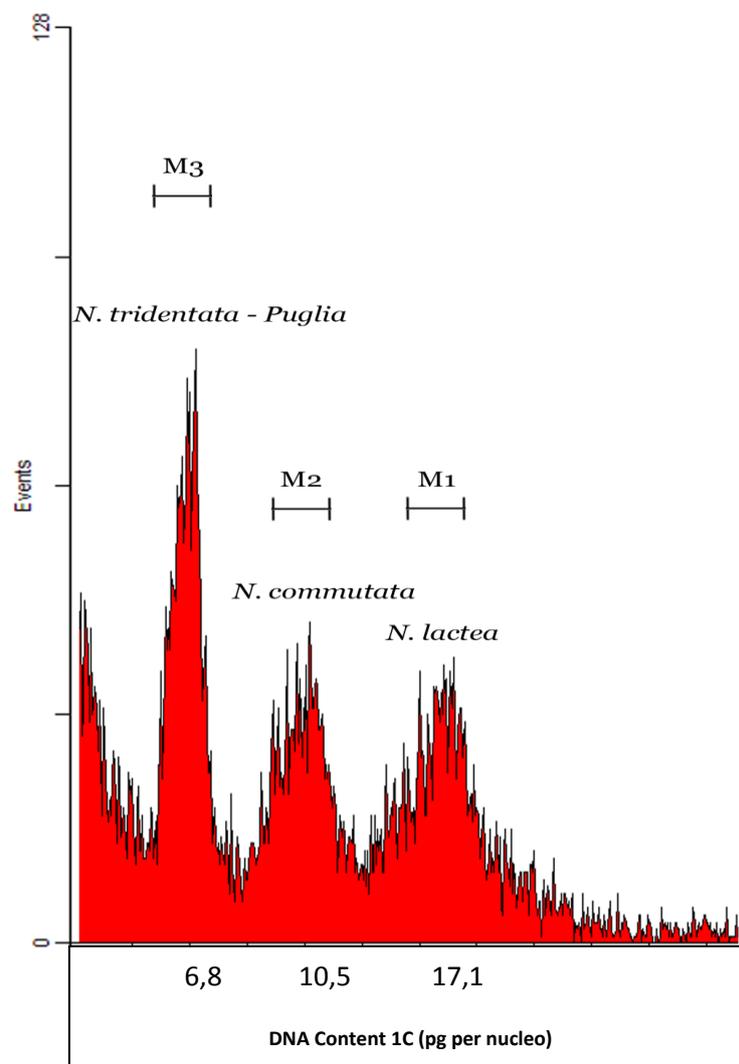


Figura 3.9. Contenuto di DNA (1-C) in nuclei isolati da polline: *N. lactea* (M1), *N. commutata* (M2), *N. tridentata* (M3).

Specificamente, il DNA content in *N. commutata* (10,46 pg) è di poco inferiore al doppio di quello riscontrato in *N. tridentata* (6,85 pg), mentre nei campioni di *N. lactea* il valore medio è pari a 17,13 pg di DNA per nucleo (Fig. 3.9). Le popolazioni di *N. commutata* hanno fornito dati coerenti ed omogenei tra loro, e lo stesso è stato verificato in *N. lactea*.

Al contrario, è stata evidenziata una marcata discrepanza tra i campioni di *N. tridentata* provenienti da tre diverse regioni (rombi azzurri in figura 3.10). Applicando il test U di Mann-Whitney, si rileva che, pur mantenendosi omogenei i valori intrapopolazionistici, il contenuto di DNA della popolazione calabrese di *N. tridentata* è significativamente maggiore rispetto ai campioni pugliesi (+21,8%; $p=0,021$) e campani (+19,6%; $p=0,021$) (Fig. 3.11).

Un unico campione di *N. commutata* (quinto quadratino rosso da sinistra in figura 3.10), appartenente alla popolazione NCADR, possiede un contenuto di DNA significativamente maggiore della media registrata per la specie. I valori registrati, anche in repliche indipendenti, confermano per questo esemplare di *N. commutata* un contenuto di DNA pari a 15,5 pg, comparabile con i valori medi rilevati in *N. lactea*.

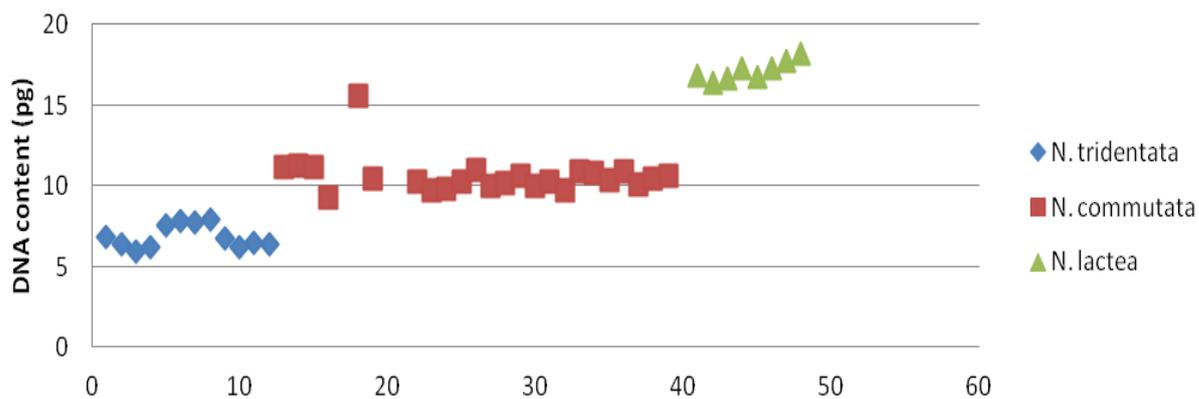


Figura 3.10 Distribuzione dei valori di contenuto aploide di DNA in *N. tridentata*, *N. commutata*, *N. lactea*.

		CFM <i>N. tridentata</i> - <i>N. commutata</i> - <i>N. lactea</i>		Contenuto di DNA in corredo cromosomico aploide - 1C (pg)		
		Codice campione	C-value calcolato	C-value medio per popolazione	C-value medio per specie	
<i>N. tridentata</i>	PUGLIA	NTRIP1	6,86			
		NTRIP3	6,37			
		NTRIP4	5,98			
		NTRIP12	6,19	6,35		
	CALABRIA	NTASP3	7,52			
		NTASP22	7,79			
		NTASP27	7,73			
		NTASP27	7,91	7,74		
	CAMPANIA	NTSAS7	6,79			
		NTSAS8	6,22			
		NTSAS10	6,51			
		NTSAS15	6,37	6,47		
					6,85	
<i>N. commutata</i>	M.te Calciniera - Linguaglossa (CT)	NCMCA[1,6,9]	11,19			
		NCMCA[10,11,12]	11,27	11,23		
	C.da Calcerana - Adrano (CT)	NCADR[1,4,5]	11,19			
		NCADR[8,10,11]	9,30	10,25		
		NCADR8	15,77			
		NCADR8 replica	15,54			
		NCADR10	10,44			
	M.te Colla - Castiglione di Sicilia (CT)	NCADR11	'			
		NCCAS[4,5,6]	'			
	M.te Catalfano - Bagheria (PA)	NCBAG5	10,26			
		NCBAG19	9,70			
		NCBAG21	9,84			
		NCBAG28	10,24	10,01		
	C.da San Leo - Belpasso (CT)	NCETN2	10,98			
		NCETN13	10,00			
		NCETN15	10,20	10,40		
	Montalbano Elicona (ME)	NCNOV3	10,58			
		NCNOV4	10,01			
		NCNOV5	10,24			
		NCNOV9	9,76			
		NCNOV13	10,92	10,30		
	Sauci Piccolo - San Vito lo Capo (TP)	NCSAP10	10,81			
		NCSAP12	10,31			
		NCSAP14	10,91			
NCSAP15		10,13	10,54			
Montalbano Elicona (ME)	NCPEL1	10,42				
	NCPEL1	10,62	10,52			
<i>N. lactea</i>	M.te Veneretta - Taormina (ME) - Sicilia	NLTAO[1,34,35]	'			
		NLTAO[40,41,42]	16,87	16,87		
	Cant.ra Cozzo Schisina - Francavilla di Sicilia (ME)	NLPEL[5,6,7]	16,40			
		NLPEL[8,9,10]	16,61	16,51		
	San Teodoro - Cesarò (ME) - Sicilia	NLSTE[6,8,9]	17,33			
		NLSTE[3,5,10]	16,76	17,04		
	M.te Colla - Castiglione di Sicilia (CT) - Sicilia	NLCOL[1,2,3,4,5,6]	17,25	17,25		
	Teggiano (SA) - Campania	NLTEG[1,2,4]	17,73			
NLTEG[6,7,8]		18,20	17,97			
					17,13	

Tabella 3.3 – Contenuto di DNA nucleare (1-C) in polline di *N. tridentata*, *N. commutata* e *N. lactea*. In rosso i valori di un unico campione di *N. commutata* con elevato contenuto di DNA.

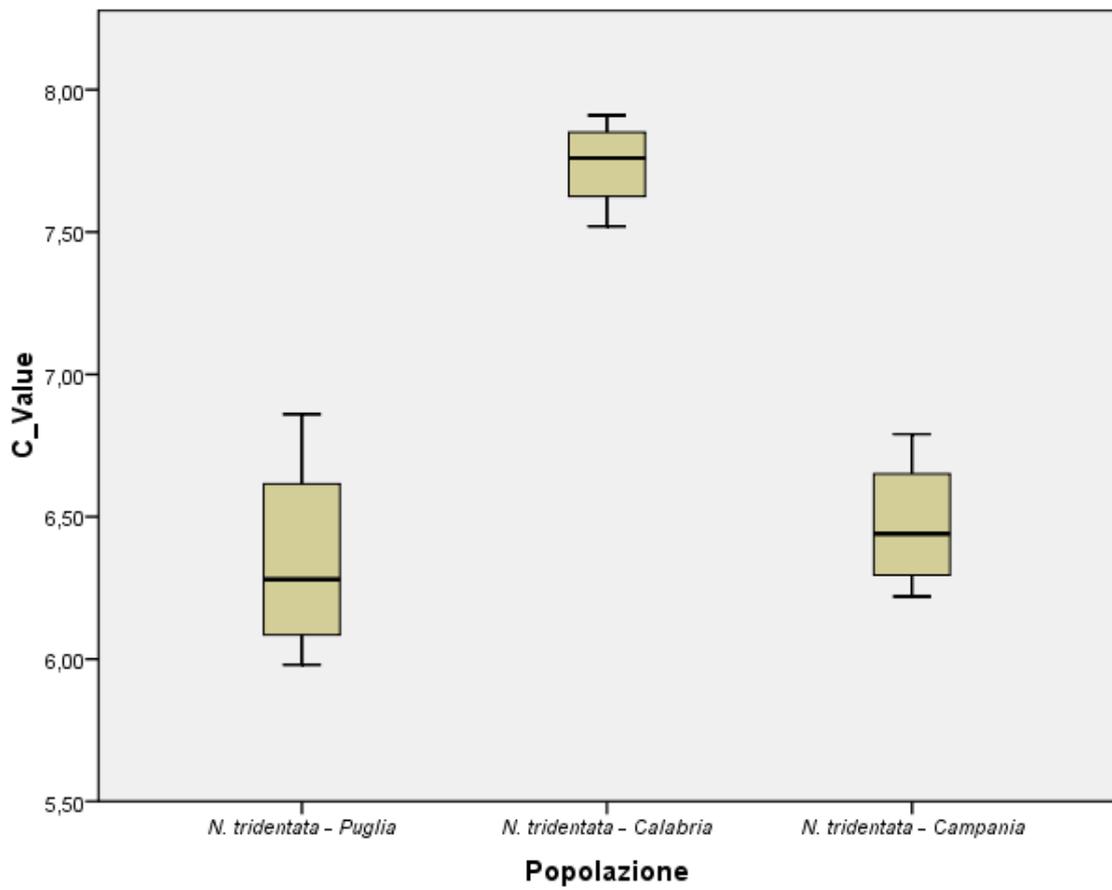


Figura 3.11 – Mediane e variabilità nei valori 1-C di contenuto di DNA rilevati in nuclei di polline di *N. tridentata* provenienti da tre regioni italiane diverse.

3.2.7 Analisi dell'efficienza di impollinazioni

Le impollinazioni manuali intraspecifiche e interspecifiche hanno prodotto quantità variabili di capsule (Tab. 3.4) e di semi vitali, negando l'esistenza di efficienti barriere post-mating alla fecondazione interspecifica tra *N. commutata*, *N. tridentata* e *N. lactea* (Fig. 3.12).

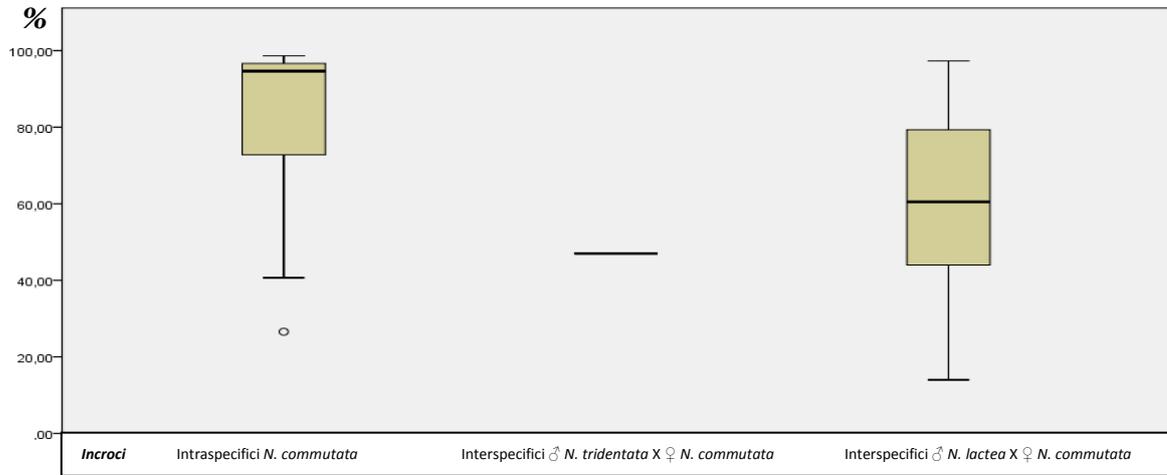
Per quantificare le differenze di successo nella produzione di semi vitali tra impollinazioni interspecifiche e quelle intraspecifiche di riferimento, il test U di Mann-Whitney ha fornito valori significativi solo nel caso di incrocio di polline di *N. lactea* con *N. commutata* ($p=0,002$), e in quello di incrocio di polline di *N. tridentata* con *N. lactea* ($p=0,011$). Tutti gli altri confronti non hanno prodotto significatività statistica.

Successo di fruttificazione

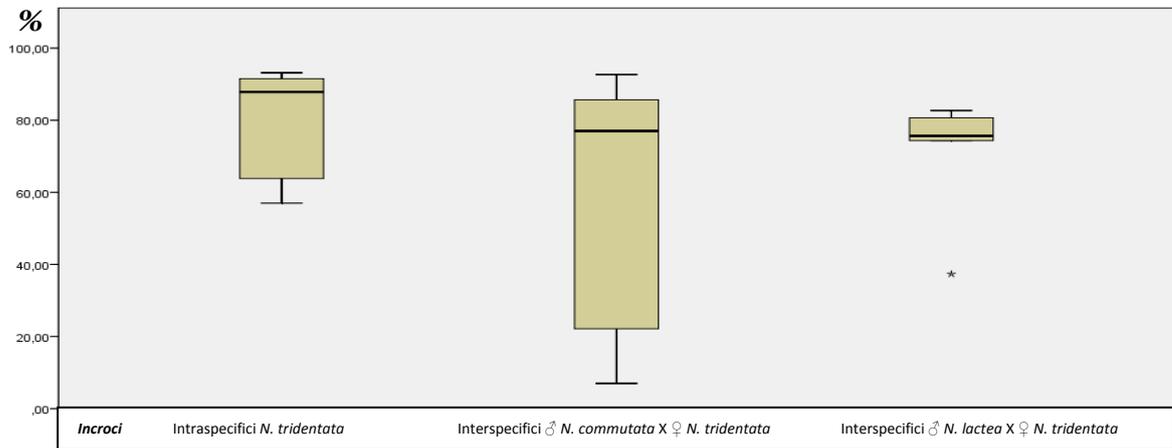
Ovari	Polline		
	<i>N. commutata</i>	<i>N. tridentata</i>	<i>N. lactea</i>
<i>N. commutata</i>	77,8%	11,1 %	70,5%
<i>N. tridentata</i>	66,7%	56,3%	33,3%
<i>N. lactea</i>	90,0%	46,2%	80,0%

Tabella 3.4. Produzione di capsule tra incroci intraspecifici ed interspecifici. Rapporto percentuale di capsule prodotte per impollinazioni effettuate.

a)



b)



c)

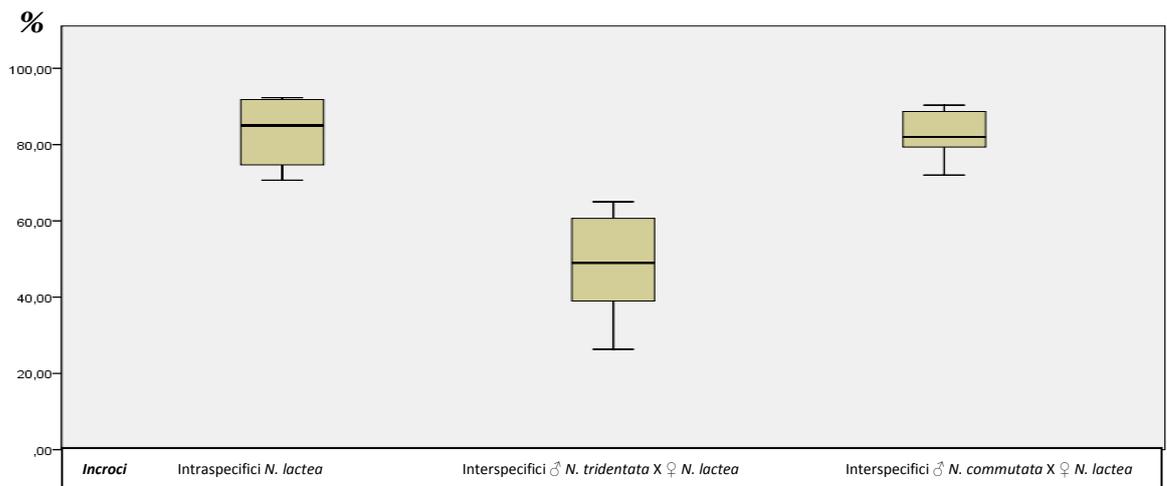


Figura 3.12. Successo riproduttivo di incroci interspecifici rispetto al corrispondente intraspecifico, espresso in percentuale di semi vitali prodotti per ogni impollinazione riuscita. A confronto: impollinazioni di fiori di *N. commutata* (a), *N. tridentata* (b) e *N. lactea* (c) con polline delle tre specie.

3.3 Discussione

I risultati ottenuti dimostrano che *N. commutata* costituisce effettivamente un'entità tassonomica poliploide. La scoperta dello status poliploide in *N. commutata* (Mazzola, 1984), rispetto alla specie diploide dalla quale sembrerebbe originarsi (*N. tridentata*), è infatti confermata sia dalle analisi kariologiche (Fig. 3.7) che da quelle citometriche (Figg. 3.9 e 3.10). Gli individui di *N. commutata* analizzati presentano un cariotipo tetraploide composto da 84 cromosomi. L'omogeneità kariologica riscontrata è suffragata anche dal confronto del contenuto nucleare di DNA mediante citometria di flusso in fluorescenza. Tutti gli individui delle diverse popolazioni di *N. commutata*, anche geograficamente distanti tra loro, presentano quantità di DNA pressochè uguali e costanti in tutto l'areale di distribuzione (DNA content 1-C: 10,46 pg) (Tab. 3.3).

Nei sistemi di specie vegetali a diversi livelli di ploidia si ritrovano normalmente condizioni kariotipiche eterogenee che caratterizzano popolazioni locali, sottospecie o anche gruppi ristretti all'interno di popolazioni più ampie. Per *N. commutata* invece, i campioni provenienti da popolazioni anche distanti tra loro, sottoposti ad analisi del cariotipo, producono invariabilmente un assetto cromosomico tetraploide ($4n=84$). Le popolazioni di *N. commutata* analizzate costituiscono quindi un insieme kariologicamente omogeneo, composto da individui che presentano un solo livello di ploidia.

Infatti nessun esemplare esaminato ha fornito indizi che giustifichino l'ipotesi di livelli di ploidia diversi dal tetraploide, né sulla base del pattern cromosomico, né tantomeno per variazioni significative del contenuto di DNA nucleare, con l'eccezione di un singolo campione di *N. commutata* (Fig. 3.8, Tab. 3.3), il cui contenuto aploide in DNA ($1C=15,5$ pg) è paragonabile a quello di *N. lactea* ($1C=17,1$ pg), o anche compatibile con un cariotipo esaploide di *N. tridentata* ($1C=6,8$ pg). Esami kariologici preliminari effettuati su questo specifico campione sembrano però escludere questa ipotesi. Il

numero cromosomico rilevato è infatti variabile, nelle piastre metafasiche esaminate, tra 75 e 79. Questi valori sono comparabili con quello di *N. commutata* ($4n=84$), ma non danno ragione della differenza nel contenuto di DNA nucleare. E' lecito quindi dedurre che questo specifico individuo debba possedere un maggior contenuto di DNA nucleare, non associato ad un aumento del numero di cromosomi rispetto a *N. commutata*. Tale anomalia potrebbe essere la conseguenza di un evento di ibridazione tra *N. commutata* ($4n=84$; $1c=10,8$ pg) e *N. lactea* ($2n=42$; $1c=17,1$ pg). La possibilità di flusso genico tra i due *taxa* è infatti supportata anche dall'analisi della vitalità dei semi in incroci interspecifici, che non ha identificato forti barriere alla fecondazione di *N. lactea* da parte di polline di *N. commutata*. Tale ipotesi giustificerebbe il rinvenimento di un individuo con numero cromosomico inferiore a *N. commutata*, ma con contenuto di DNA più elevato rispetto a quest'ultima. Ad ogni modo, tale condizione cariologica è da ritenersi occasionale, se non rara, rispetto al citotipo dominante.

La analisi kariologiche suggeriscono inoltre che *N. commutata* può essere considerata come il prodotto di un unico evento di poliploidizzazione. Infatti, le dimensioni e la morfologia dei cromosomi risultano costanti tra diversi esemplari e tra diverse popolazioni; analogamente il contenuto di DNA nucleare non mostra variazioni significative tra le unità campionarie utilizzate (Tab. 3.3). Ciò suggerisce che eventuali effetti secondari sul riarrangiamento del genoma poliploide sono comuni a tutti i campioni di *N. commutata*, indicando una loro origine unica.

Per accertare l'eventuale presenza di *N. tridentata* in simpatria con *N. commutata* in Sicilia, sono state effettuate sia analisi kariologiche che citometriche.

Una distinzione su base puramente morfologica tra *N. commutata* tetraploide e *N. tridentata* diploide infatti, non è attendibile. Sebbene vengano indicate per *N. commutata* dimensioni maggiori dello scapo, dell'infiorescenza e del fiore, rispetto a *N. tridentata* (Mazzola, 1984), tali differenze non trovano riscontro significativo nelle analisi morfometriche. La PCA (Fig. 3.4) infatti produce per *N. commutata* una

distribuzione di punti pressoché sovrapponibile a quella di *N. tridentata*, e quindi non evidenzia divergenze morfologiche significative tra le due specie.

L'unica differenza sostanziale che permette la distinzione tra *N. commutata* e *N. tridentata* risiede, come abbiamo visto, nell'assetto cromosomico tetraploide della prima, rispetto a quello diploide della seconda. In questo senso, poiché tutti i campioni di *N. commutata* sono caratterizzati da corredo cromosomico tetraploide ($4n=84$) e da DNA content 1-C costante (Tab. 3.3), pari a circa 10,5 pg, è possibile affermare che questa specie non condivide l'areale di distribuzione con la sua parentale putativa *N. tridentata*, la quale non sembra presente in nessun distretto geografico siciliano.

Le analisi cromosomiche, morfologiche e molecolari, non forniscono una indicazione univoca per distinguere una possibile origine autoploiploide da una allopoliploide in *N. commutata*.

Le caratteristiche cariologiche riscontrate infatti evidenziano in *N. commutata* una morfologia cromosomica sostanzialmente analoga a quella di *N. tridentata*, sebbene con numero cromosomico doppio, che fanno propendere per un'ipotesi di autoploiploidia. D'altro canto però, le formazioni di bivalenti riscontrate nelle piastre in zigotene (Fig. 3.8) possono suggerire sia un evento di allopoliploidia, che una possibile autoploiploidizzazione interrazziale. Questo è un tipo di speciazione per poliploidizzazione in cui un riarrangiamento cromosomico segue la fusione di due genomi diploidi di popolazioni differenziate della stessa specie. Le lievi differenze morfologiche dei cromosomi inizialmente omologhi si fissano al punto che questi, invece di formare delle tetradi, si diversificano in due coppie di cromosomi omologhi.

Dal confronto morfometrico di *N. commutata* con *N. tridentata* e *N. lactea*, per la forma e le dimensioni di labello e sperone, i profili delle tre specie non si differenziano significativamente (Fig. 3.3) e *N. commutata* non presenta dimensioni intermedie tra *N. lactea* e *N. tridentata* (Fig. 3.4), come ci si aspetterebbe da un allopoliploide. Al contrario, le dimensioni medie di *N. commutata*, lievemente maggiori che in *N.*

tridentata, forniscono un ulteriore indizio di un'origine per autopoliploidia da *N. tridentata*. Specialmente nelle orchidee infatti, i *taxa* allopoliploidi presentano spesso caratteri morfologici intermedi tra quelli delle due specie parentali (Shipunov & Bateman, 2005), mentre gli autopoliploidi sono caratterizzati da dimensioni maggiori dei diploidi di provenienza (Grant, 1981; Thompson, 2005), come già suggerito, proprio per *N. commutata*, da Mazzola (1984).

Al contrario, l'evidenza del cpDNA di *N. lactea* invariabilmente fissato in tutti i campioni di *N. commutata* esaminati, non ci permette di escludere completamente un'ipotesi di allopoliploidia tra *N. tridentata* e *N. lactea*. Analogamente, la presenza di entrambi i ribotipi ITS1 di *N. lactea* e *N. tridentata* in un consistente numero di esemplari di *N. commutata* (13%), può essere spiegata come il residuo di un antico evento di ibridazione seguito da una allopoliploidizzazione tra *N. tridentata* e *N. lactea*.

L'unico individuo con contenuto cromosomico e genomico intermedio tra le due specie parentali potrebbe rappresentare una prova indiretta di questo eventuale meccanismo per la genesi di *N. commutata*, permettendo di spiegare l'acquisizione di DNA plastidiale di *N. lactea* e l'occasionale presenza di DNA nucleare di *N. lactea* nel genoma di *N. commutata*.

Escludendo la presenza di *N. tridentata* in Sicilia, l'incrocio tra *N. commutata* e *N. tridentata* è un evento altamente improbabile in natura a causa dei distinti areali di distribuzione delle due specie. Cionondimeno, impollinazioni manuali effettuate in condizioni controllate, dimostrano che non esistono effettive barriere riproduttive post-mating tra le due specie, e qualora si trovassero in simpatria, anche i periodi di fioritura pressoché sovrapposti non costituirebbero una barriera riproduttiva.

La possibilità di incrocio di *N. commutata* con *N. lactea* in natura invece non è impedita da distanze geografiche, data la simpatria delle due specie in Sicilia, ma di sicuro è limitata dai differenti picchi fenologici tra le due specie, sfalsati di circa un mese, che costituiscono di per sé una barriera riproduttiva al flusso genico.

Inoltre, i test di incrocio interspecifico effettuati, dimostrano che eventuali incroci tra *N. commutata* e *N. lactea* risentirebbero anche di un qualche meccanismo di isolamento riproduttivo parziale. Il confronto degli incroci tra *N. commutata*, *N. tridentata* e *N. lactea* ha infatti fornito valori che pur non negando la possibilità di produzione di una certa quota di semi vitali da incroci interspecifici, identificano l'esistenza di una parziale incompatibilità riproduttiva post-mating. Questa barriera parziale condiziona negativamente sia il successo riproduttivo di *N. commutata* con polline di *N. lactea*, che quella di *N. lactea* con polline di *N. tridentata*.

Al contrario, non sembrano sussistere riduzioni significative nella vitalità dei semi prodotti dall'incrocio di polline *N. commutata* con *N. lactea*.

Ciò potrebbe suffragare l'ipotesi che nell'evento di ibridazione tra *N. commutata* e *N. lactea*, quest'ultima specie più probabilmente avrà fornito la linea materna (e quindi cpDNA) nella formazione di eventuali organismi vitali ibridi.

3.4 Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti, due possibili scenari, non necessariamente alternativi l'uno all'altro, che differiscono nei tempi dell'evento di ibridazione con *N. lactea*, possono essere ipotizzati per spiegare l'attuale composizione genetica di *N. commutata* in Sicilia.

Entrambe queste ipotesi prevedono comunque un iniziale insediamento di alcuni individui di *N. tridentata* sull'isola.

N. tridentata dalla penisola italiana potrebbe aver colonizzato il territorio siciliano con uno sporadico evento di dispersione. Sull'isola, in seguito alla copresenza *N. lactea*, si sarebbe generato un ibrido diploide dall'incrocio di polline di *N. tridentata* con *N. lactea*. Questo ibrido (che avrebbe ricevuto il DNA plastidiale dalla linea materna, cioè da *N. lactea*), sarebbe stato caratterizzato da un iniziale contenuto di DNA nucleare presumibilmente intermedio tra quelli dei parentali (all'incirca 12 pg). A questo primo fenomeno di ibridazione sarebbe poi seguita una lunga serie di reincroci con *N. tridentata*, che avrebbero portato, da un lato, alla rarefazione fino alla scomparsa di *N. tridentata* dall'isola e, dall'altro, ad un riarrangiamento progressivo nel genoma degli individui della popolazione ibrida, con l'effetto di diluizione del contributo genetico (e morfologico) di *N. lactea* a favore di quello di *N. tridentata*. Infine, un evento di poliploidizzazione sarebbe avvenuto nella popolazione dell'ibrido (con corredo diploide ormai quasi interamente di *N. tridentata*), spiegandone l'attuale corredo cromosomico tetraploide ed una sua antica origine per allopoliploidia.

Una seconda ipotesi prevede che, una volta che un piccolo insediamento di *N. tridentata* si fosse stabilito sull'isola, si sia prima costituito l'autotetraploide *N. commutata* e che questo abbia praticamente soppiantato l'iniziale insediamento di *N. tridentata*. Successivamente, il polline di questo tetraploide avrebbe ibridizzato con *N. lactea*, producendo ibridi con corredo nucleare triploide e contributo plastidiale di *N.*

lactea. Tali ibridi si sarebbero quindi ripetutamente reincrociati con *N. commutata*, producendo, nel corso delle generazioni, un progressivo aumento del numero cromosomico ed una diluizione del genoma di *N. lactea* che si riscontrano oggi nelle attuali popolazioni di *N. commutata*.

Entrambe le ipotesi sono supportate dal contenuto di DNA comparabile a un tetraploide di *N. tridentata*, dall'assetto cromosomico molto simile e dalla formazione di bivalenti (e non di tetravalenti) in zigotene (ad indicazione di riarrangiamenti cromosomici avvenuti durante la serie di reincroci tra l'ibrido interspecifico e *N. tridentata*). Infine, tale scenario giustifica sia la presenza in *N. commutata* del DNA plastidiale di *N. lactea* che le tracce di DNA ribosomale di quest'ultima.

Gli attuali risultati non delineano con certezza quale scenario si sia realmente verificato. Tuttavia le barriere riproduttive interspecifiche identificate negli incroci di polline di *N. tridentata* su *N. lactea*, suggeriscono che la prima ipotesi, che implica la formazione di un ibrido diploide da questo incrocio, sia meno probabile. La seconda ipotesi contempla che l'incrocio supposto sarebbe invece avvenuto tra il polline di un autotetraploide di *N. tridentata* e *N. lactea*. I risultati degli incroci manuali non registrano in effetti impedimenti all'incrocio di polline di *N. commutata* su *N. lactea*. Anzi confermano una significativa barriera al flusso genico nell'incrocio opposto, dando sostegno all'ipotesi della formazione di una popolazione di ibridi con *N. lactea* come linea materna (e donatore del cpDNA).

Un'ipotesi alternativa, che prevede solo uno sporadico arrivo di polline di *N. tridentata* dalla penisola che avrebbe impollinato *N. lactea*, residente sull'isola, avrebbe generato un ibrido prima diploide (e poi un poliploide) che non si sarebbe potuto reincrociare con *N. tridentata* ma solo eventualmente con *N. lactea*. Tale ipotesi, anche se spiegherebbe l'origine del cpDNA di *N. commutata* e la totale assenza di *N. tridentata* dall'isola, sembra assai poco plausibile alla luce del fatto che *N. commutata* somigli, sia

come corredo cromosomico che come contenuto di DNA e morfologia, a *N. tridentata* e non a *N. lactea*.

Indipendentemente dai tempi, l'ibrido potrebbe essere stato favorito dalla selezione, per via dell'aumentata eterozigosità e del contributo plastidiale di *N. lactea*, nell'adattamento alla nuova nicchia ecologica insulare. Nelle orchidee infatti, è stato dimostrato un alto potenziale di flusso genico interspecifico anche tra diversi livelli di ploidia (Aagaard & al. 2005; Ståhlberg & Hedrén, 2009), e per alcuni autori (Chapman & Abbot, 2010), questo “trasferimento di adattamento” unidirezionale da diploide a tetraploide, per mezzo di introgressione unidirezionale, può aumentare l'adattabilità del tetraploide agli ambienti del diploide. Questo meccanismo spiegherebbe l'assenza dal territorio siciliano della specie parentale *N. tridentata*, rispetto alla quale *N. commutata* possiede forse il vantaggio adattativo che deriverebbe dall'ibridazione direzionale di *N. lactea*. E' infatti possibile che le condizioni ecologiche dei territori siciliani non abbiano permesso, e non permettano tuttora, la diffusione di *N. tridentata*, specie a distribuzione continentale tipicamente centroeuropea, e che il flusso genico con le popolazioni locali di *N. lactea* abbia costituito la condizione necessaria per l'affermazione di *N. commutata* nella nuova nicchia ecologica.

3.5 Bibliografia

- Aagaard SMD, Saåstad SM, Greilhuber J, Moen A. 2005.** A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (Orchidaceae). *Heredity*, 94: 488–496.
- Brochmann C, Stedje B, Borgen L. 1992.** Gene flow across ploidal levels in *Draba* (Brassicaceae). *Evolutionary Trends in Plants* 6: 125–134.
- Carlquist S. 1974.** *Island biology*. Columbia University Press: New York & London.
- Chapman MA & Abbott RJ. 2010.** Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New Phytologist*, 186(1): 63-1.
- Chen ZJ. 2007.** Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annu Rev Plant Biol.*, 58: 377–406.
- Coyne JA & Orr HA. 1998.** The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. B* 353: 2878–2305.
- Darwin CR. 1859.** *On the Origin of Species*. London: John Murray.
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF. 2008.** Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 443–61.
- Gavrilets S. 2003.** Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution*, 57:2197-2215.
- Gillespie G & Roderick GK. 2002.** Arthropods on Islands: Colonization, Speciation, and conservation. *Annual Review of Entomology*, Vol. 47: 595-632
- Grant VP. 1981.** Polyploidy. Columbia University Press, New York, pp.283-352.
- Greuter W. 1991.** La nécessité de conservation des ressources génétiques. In *La conservation des espèces sauvages progénitrices des plantes cultivées*, ed. Conseil de l'Europe, pp. 12–19. Strasbourg: Conseil de l'Europe.

- Hedrén M, Fay MF, Chase MW. 2001.** Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploidy evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88(10): 1868–1880.
- Hedrén M, Nordström S, Ståhlberg D. 2008.** Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, 17, 5075–5091
- Hedrén M. 1996a.** Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in Northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): Evidence from allozyme markers. *Plant Systematics and Evolution*, 201: 31–55.
- Hedrén M. 1996b.** The allotetraploid nature of *Dactylorhiza praetermissa* (Orchidaceae) confirmed. *Watsonia*, 21: 113–118.
- Hedrén M. 1996c.** Electrophoretic evidence for allotetraploid origin of *Dactylorhiza purpurella* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*, 16: 127–134.
- Kadereit JW, Griebeler EM, Comes HP. 2004.** Quaternary diversification in European alpine plants: pattern and process. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359: 265–274.
- Kruckeberg AR & Rabinowitz D. 1985.** Biological Aspects of Endemism in Higher Plants. *Ann. Rev. Ecol. Sys.*, 16: 447–479.
- Lobo JM, Lumaret JP, Jay-Robert P. 2001.** Diversity, distinctiveness and conservation status of the mediterranean coastal dung beetle assemblage in the Regional Natural Park of the Camargue (France). *Diversity and Distributions*, 7: 257–270.
- Lomolino, M.V. 2006.** The island role and a research agenda for studying ecogeographical patterns. *J. Biogeogr.*, 33: 1503–1510.
- Lord RM, Richards AJ. 1977.** A hybrid swarm between the diploid *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soo and the tetraploid *D. purpurella* (T. & TA Steph.) Soo in Durham. *Watsonia*, 11(3): 205 – 210.
- MacArthur RH & Wilson EO. 1967.** *The Theory of Island Biogeography*. Princeton NJ. Princeton Univ. Press.

- Major J. 1988.** Endemism: a botanical perspective. In *Analytical biogeography. A integrative approach to the study of animal and plant distributions*, A.A. Myers and P.S. Giller (eds.). London, Chapman & Hall: 117–146.
- Mayr E. 1942.** *Systematics and the Origin of Species*, Columbia University Press.
- Mayr E. 2000.** The biological species concept, In *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate* (Wheeler, Q.D. and Meier, R., eds), pp. 16–29, Columbia University Press.
- Mazzola P. 1984.** Cytogeographic aspects of *Orchis commutata* Tod. (*Orchidaceae*). *Webbia*, 38: 773-779.
- Médail F & Quézel P. 1997.** Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84: 112-127.
- Menken SBJ, Smit E, HCMD Nijs. 1995.** Genetical population structure in plants: Gene flow between Diploid Sexual and Triploid Asexual Dandelions (*Taraxacum* Sec. *Ruderalia*). *Evolution*, 49(6): 1108-1118.
- Paun O, Fay MF, Soltis DE, Chase MW. 2007.** Genetic and epigenetic alterations after hybridization and genome doubling. *Taxon*, 56: 649–656.
- Paun O, Bateman RM, Fay MF, Hedrén M, Civeyrel L, Chase M. 2010.** Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid Orchids (*Dactylorhiza*: *Orchidaceae*). *Mol. Biol. Evol.* 27(11): 2465–2473.
- Pillon Y, Fay MF, Hedrén M, Bateman RM, Devey DS, Shipunov AB, van der Bank M, Chase M. 2007.** Evolution and temporal diversification of western European polyploidy species complexes in *Dactylorhiza* (*Orchidaceae*). *Taxon*, 56(4): 1185-1208.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 589–639.
- Riesenberg LH & Willis JH. 2007.** Plant Speciation. *Science*, 317(5840): 910-914.
- Schubert I. 2007.** Chromosome Evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2): 109-115.

- Shipunov AP & Bateman RM. 2005.** Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 1–12.
- Soltis DE & Soltis PS. 1995.** The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(18): 8089-91.
- Soltis DE & Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree*, 14(9): 348-352.
- Ståhlberg D & Hedrén M. 2009.** Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, 23(2): 295-328.
- Thompson JD & Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends Ecol. Evol.*, 7, 302-307.
- Thompson JD. 2005.** *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.
- Wallace AR. 1880.** *The origin of species and genera*.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Reiseberg. 2009.** The frequency of polyploid speciation in vascular plants *PNAS*, 106(33): 13875-13879.

Appendice

Materiali e Metodi

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il protocollo di Doyle e Doyle (1987). L'estrazione di DNA totale è stata effettuata tramite rottura meccanica del tessuto e delle cellule, lisi degli organuli, eliminazione delle proteine e successiva purificazione del DNA.

Ogni campione è stato frantumato meccanicamente e risospeso in 600 µL di tampone di lisi CTAB 2x. Questo tampone contiene: sali, quali NaCl e Tris HCl, EDTA, che è un chelante per gli ioni Mg²⁺ e Ca²⁺, utilizzato per inibire le attività Dnasiche e β-mercaptoetanolo che ha la funzione di inibire la perossidasi e la polifenolossidasi e mantenere un ambiente riducente. La lisi è stata effettuata a 60°C per 30 minuti, agitando spesso il campione, ed è stata seguita da 5 minuti di incubazione su ghiaccio. Per rimuovere i restanti contaminanti proteici dalla soluzione sono state effettuate varie estrazioni con solventi organici (cloroformio:alcol isoamilico, 24:1). Il DNA è stato successivamente precipitato tramite l'aggiunta, alla sola fase acquosa, di 0.7 volumi di alcol isopropilico ed incubato a -80°C per circa un'ora o a -20°C per tutta la notte. Segue una centrifugazione per 30 minuti a 4°C a 12000 x g. Il pellet è stato lavato in EtOH 70% freddo, asciugato e risospeso in 50 µl di acqua bidistillata sterile.

Elettroforesi su gel d'agarosio

La concentrazione del DNA estratto è stata stimata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. L'elettroforesi su gel permette di separare, identificare ed eventualmente purificare frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. Poiché la capacità di migrazione è funzione della concentrazione di agarosio presente nel gel, si utilizzano, in

base alla lunghezza dei frammenti di DNA da separare, gel a diverse concentrazioni di agarosio. In questo caso è stato utilizzato un gel d'agarosio costituito dallo 0.8% di agarosio in TEB 1X con aggiunta di bromuro di etidio. Il bromuro di etidio si intercala tra le basi di DNA producendo una fluorescenza rosso-arancio quando viene esposto a radiazioni ultraviolette (260-360 nm). La corrente applicata al gel determina la formazione di un campo elettrico che fa migrare il DNA dal polo negativo al polo positivo, in virtù delle cariche elettriche negative conferitegli dai gruppi fosfato. Molecole di DNA lineari a doppio filamento migrano con una velocità che è inversamente proporzionale al log₁₀ del loro peso molecolare. Un'aliquota del campione di DNA estratto viene caricata sul gel e fatta migrare contemporaneamente ad un marcatore di peso molecolare noto.

Amplificazione delle sequenze ribosomali e plastidiali

Le sequenze ribosomali e plastidiali sono state amplificate mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR). La PCR è un metodo di amplificazione in vitro di sequenze specifiche di acidi nucleici, a partire anche da una singola molecola di DNA stampo (template). Gli stampi di DNA sono filamenti singoli che possono essere prodotti semplicemente riscaldando il DNA a temperature prossime ai 90°C.

Il risultato di questo processo è la formazione di due molecole figlie di DNA a doppia elica, identiche tra loro e composte da un filamento parentale e da un filamento di DNA di nuova sintesi complementare. L'enzima che catalizza la polimerizzazione delle catene polinucleotidiche a partire da singoli monomeri nucleotidici è noto come DNA polimerasi. Quest'enzima mantiene la sua funzionalità anche in vitro, quindi può essere utilizzato in laboratorio per sintetizzare nuove molecole di DNA tramite la reazione della

polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). I passaggi di base della PCR sono: denaturazione al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato, appaiamento (annealing) di coppie di oligonucleotidi di sequenza specifica (primer) scelti in modo da essere omologhi a sequenze che si trovano all'interno dello stampo di DNA e allungamento da parte della DNA polimerasi a partire dai primer per copiare lo stampo di DNA.

Questi tre passaggi sono ripetuti molte volte (per molti cicli, in genere tra i trenta e i quaranta) per amplificare lo stampo di DNA. Se in ciascun ciclo viene prodotta una copia di ciascuno dei filamenti dello stampo, il numero di molecole di DNA raddoppia in maniera esponenziale a ogni ciclo.

A causa di quest'andamento esponenziale, alla fine di 20 cicli sono stati prodotti più di un milione di copie del tratto di DNA d'interesse.

Usando la Taq DNA polimerasi, l'amplificazione per PCR funziona, in genere, nel modo migliore se i primer si legano a regioni dello stampo che non distano più di 1-3 kb (può anche copiare frammenti lunghi fino a 10 kb).

In particolare sono stati amplificati uno spaziatore interno del DNA ribosomale nucleare (ITS1) e diverse regioni plastidiali. Per le amplificazioni sono state utilizzate coppie di primer specifici precedentemente descritti da Aceto *et al.* (1999) per l'ITS1 e da Ebert & Peakall (2009) per i tratti plastidiali. Tra le regioni plastidiali testate, è stato selezionato il locus plastidiale *yef4-cemA*, amplificato mediante primer ANU_cp075-L e ANU_cp076-R (Ebert & Peakall, 2009). All'interno della sequenza ottenuta, ritenuta informativa per presenza di indel, è stata disegnata una coppia di primer interni (O_com-F: 5'-GGTTCGTCTTGAAGTCCAAATAA-3' e O_com-R: 5'-TCCAGAGATCTCAATTAGGCAAA-3') che producessero amplificati di lunghezza sufficientemente breve da evidenziare eventuali delezioni mediante elettroforesi in gel d'agarosio.

La reazione di PCR è stata così allestita:

DNA
Tampone della Taq
MgCl ₂
dNTPs
Primer
Taq polimerasi
Volume finale

L'amplificazione è stata eseguita in un termocicizzatore Applied Biosystem 2720. I prodotti amplificati sono stati visualizzati su gel di agarosio 2% e fotografati dopo colorazione con bromuro di etidio.

Purificazione dei prodotti amplificati

Nucleotidi, primers ed enzima in eccesso vengono allontanati dal prodotto di amplificazione utilizzando il GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, seguendo il protocollo consigliato dalla casa (Amersham Biosciences). I campioni sono purificati con un passaggio su colonnine fornite dal Kit in cui è impaccata una matrice a fibre di vetro. Il passaggio attraverso questa matrice consente di rimuovere dalla soluzione tutte le impurità aumentando notevolmente il grado di purezza del DNA, che viene successivamente eluito in acqua bidistillata sterile. L'amplificato ottenuto dopo la purificazione è stato direttamente sequenziato.

Reazioni di sequenza

Circa 100 ng del prodotto purificato di amplificazione è stato utilizzato per allestire la reazione di sequenza secondo il metodo enzimatico di Sanger *et al.* (1977), utilizzando il BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), il cui enzima è l'AmpliTaq DNA polimerasi. Questo enzima è una forma mutante della Taq polimerasi, privo dell'attività nucleasica 5' - 3' e con capacità di discriminare tra i dideossinucleotidi drasticamente ridotta.

Ciascuna reazione ha volume finale di 5 µl e contiene:

2 µl di Terminator Ready Reaction Mix

100 ng di DNA purificato

1.6 µM di *primer* (*forward* o *reverse*)

tampone 1X

2,5 µl di acqua bi distillata

Utilizzando un termocicizzatore le condizioni di sequenziamento, per un totale di 30 cicli, sono state le seguenti:

96 °C per 10 secondi

50 °C per 5 secondi

60 °C per 4 minuti

I terminatori in eccesso vengono allontanati aggiungendo ad ogni reazione 1/10 del volume di reazione di acetato di sodio (3 M, pH 4.6) ed il doppio del volume di reazione di etanolo assoluto. Dopo 30 minuti a -80 °C, segue una centrifugazione a 4°C per 30 minuti a 12000 rpm.

Il precipitato è lavato per due volte con etanolo 70% freddo ed asciugato sottovuoto. Ogni campione è risospeso in 15 µl di formammide, poi denaturato a 94 °C

per 2 minuti. Le sequenze vengono successivamente caricate in un sequenziatore automatico capillare Applied Biosystems 3130.

Analisi morfologiche

L'analisi morfometrica è stata volta a stimare le differenze nell'espressione dei tratti negli individui campionati. Con questo scopo ogni singolo fiore, precedentemente campionato e conservato in etanolo 70% a 4°C, è stato sezionato nelle singole parti floreali. Le singole parti floreali sono state poi poste su un cartoncino lucido e l'intero cartoncino così allestito è stato posto su uno scanner per l'acquisizione delle immagini delle singole parti floreali. Una volta digitalizzata l'immagine, la misurazione dei singoli caratteri floreali è stata effettuata utilizzando il software ImageJ 1.33 (Rasband - National Institute of Health, USA). In modo particolare sono state misurate: la lunghezza e la larghezza del labello (yLab, xLab) e dello sprone (ySpr, xSpr).

L'analisi della morfometria floreale è stata inoltre effettuata mediante il software tpsDIG2 v. 2.16 e tpsRelw v. 1.49 (Copyright 2010 F. James Rohlf TPS Suite Software; Rohlf, 2003a, 2003b), identificando 24 landmark sul margine di labello e sperone di 176 individui da 12 popolazioni di *N. commutata*, 56 individui da 7 popolazioni di *N. lactea* e 61 individui da 3 popolazioni di *N. tridentata*. Il set di landmark utilizzato è stato definito sulla base di esempi classici di misure in morfometria (Bateman & Denholm, 1983, 1985; Tyteca & Gathoye, 2000; Shipunov & Bateman, 2005). Mediante il software tpsRelw v. 1.49 (Copyright 2010 F. James Rohlf), per ciascuna specie sono state calcolate la configurazione media dei landmark (*consensus*) (Fig. 3.5 B, D, F) e la

deviazione di ogni campione da questa (*Weigth Scores Matrix*). L'insieme dei dati raccolto è stato sottoposto ad Analisi delle Componenti Principali (PCA).

Esperimenti di impollinazione manuale e vitalità dei semi

Gli incroci manuali di impollinazione sono stati effettuati in un'area sperimentale allestita presso il Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università Federico II di Napoli.

Per evitare eventi incontrollati di impollinazione le piante sono state posizionate all'interno di una gabbia ricoperta da una rete a maglie sottili che ha impedito l'accesso ai fiori da parte di impollinatori occasionali. Gli incroci sono stati effettuati utilizzando bacchette "Dispoinoc", normalmente usate per lavori batteriologici, per il prelievo e la deposizione di polline.

Le piante utilizzate per gli incroci sono state raccolte almeno un anno prima dell'utilizzo in popolazioni spontanee in varie zone del sud Italia e della Sicilia.

Sono stati effettuati incroci tra individui di specie diverse (interspecifici) e, come controllo, tra individui della stessa specie (intraspecifici). Gli incroci interspecifici sono stati effettuati in entrambe le direzioni e cioè ciascuna specie ha donato e ricevuto il polline.

Lo sviluppo dei frutti è stato monitorato periodicamente fino alla loro maturazione. I frutti, una volta maturi, sono stati raccolti e conservati in gel di silice. Per stabilire la vitalità dei semi in essi contenuti, da ciascun frutto sono stati osservati circa 300 semi che sono stati assegnati a due categorie mutualmente esclusive in base alla presenza o meno di un embrione (rispettivamente semi vitali e semi non vitali). L'osservazione è stata condotta al microscopio ottico con un ingrandimento 10X.

Analisi carilogiche

La preparazione dei cromosomi mitotici e meiotici è stato effettuato utilizzando ovari immaturi. Questi sono stati pretrattati con 0,3% con colchicina a temperatura ambiente per due ore circa. Il materiale è stato colorato utilizzando un colorante Feulgen fresco. Per la colorazione Feulgen sono stati fissati per 5 minuti in 5:1:1:1 (v/v) in etanolo assoluto:cloroformio:acido acetico glaciale:formalina. L'idrolisi è avvenuta a 20°C in 5,5 N di HCL per 20 minuti (Battaglia, 1957). Gli ovari sono stati successivamente schiacciati in acido acetico 45 % e osservati al microscopio ottico.

Citometria a flusso (FCM)

La tecnica della citometria a flusso è stata utilizzata per stimare il diverso livello di ploidia utilizzando, come materiale di analisi, i pollinodi prelevati da ciascun individuo. Le massule polliniche sono state separate dal viscidio sospendendole in 1 ml di buffer per l'isolamento dei nuclei (Galbraith *et al.*, 1983; Pfosser *et al.*, 1995). La soluzione è stata incubata per 2 min su ghiaccio e successivamente i pollinodi sono stati frammentati con un bisturi. Le cellule sono state filtrate a 30 micron e trattate con una soluzione colorante (1mg/ml RNasi e 50µg/ml di bromuro di propidio) per 2 ore a temperatura ambiente. L'analisi del DNA in citometria a flusso è stata eseguita utilizzando l'apparecchio FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) che monta un laser a ioni di argon raffreddato ad acqua (488nm, 150mw), software Cell Quest (Becton Dickinson) ed associato ad un modulo di discriminazione dei doppietti.

Bibliografia

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Ebert D, Peakall R. 2009.** A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of non coding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. *Molecular Ecology Resources* 9: 777–783.
- Rasband WS, ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2011.
- Rohlf FJ. 2003a.** *tpsDig* v. 1.39. Ecology and Evolution, SUNY, Stony Brook.
- Rohlf FJ. 2003b.** *tpsRehw* v. 1.35. Ecology and Evolution, SUNY, Stony Brook.
- Bateman RM, Denholm I. 1983.** A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 1. The tetraploid marsh-orchids. *Watsonia*, 14: 347–376.
- Bateman RM, Denholm I. 1985.** A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 2. The diploid marsh-orchids. *Watsonia*, 15: 321–355.
- Tyteca D, Gathoye JL. 2000.** Morphometric analysis of the *Dactylorhiza majalis* group in France and western Europe, with a description of *Dactylorhiza parvimajalis* Tyteca et Gathoye, spec. nov. *Journal Europäischer Orchideen*, 32: 471–511.

- Shipunov AB & Bateman MB. 2005.** Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 1–12.
- Battaglia E. 1957.** A simplified Fuelgen method using cold hydrolysis. *Caryologia*, 9: 372-373.
- Pfossier M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E. 1995.** Evaluation of Sensitivity of Flow Cytometry in Detecting Aneuploidy in Wheat Using Disomic and Ditelosomic Wheat-Rye Addition Line. *Cytometry*, 21: 387-393.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983.** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.