

Università degli Studi della Tuscia di Viterbo
Dipartimento di Tecnologia Ingegneria e Scienze dell'Ambiente e delle Foreste

Dottorato di Ricerca in
Scienze e Tecnologie per la Gestione Forestale
XIX ciclo

**La biosistemica molecolare del genere *Acer*: applicazione del metodo
barcoding alle specie italiane**

Settore scientifico disciplinare AGR05

Coordinatore Prof. Gianluca Piovesan
Tutor Prof. Bartolomeo Schirone
Dottoranda Claudia D'Ambrosio

La biosistemica molecolare del genere *Acer*: applicazione del metodo barcoding alle specie italiane



(C. Peron)

“Per un sempre troppo breve periodo in autunno le foreste ed i giardini delle zone temperate si dipingono di scarlatto, di giallo, d’oro, quando gli aceri, tra i più spettacolari tra tutti gli alberi, adornano il bosco.” (van Gelderen)

Riassunto

Numerosi *taxa* ascrivibili al genere *Acer*, non solo a livello nazionale, sono ancora scarsamente caratterizzati dal punto di vista tassonomico.

Nonostante le applicazioni della biotecnologia molecolare, come il sequenziamento del DNA, siano state oramai acquisite come uno strumento routinario nell'identificazione delle specie sia animali che vegetali, al momento non esistono studi di questo tipo su nessuna specie afferente al genere forestale *Acer* sia a livello nazionale che internazionale.

In questo contesto si è quindi pensato di applicare la tecnica del DNA barcoding per valutare le potenzialità di questa metodologia in *Acer* sia come strumento tassonomico sia come complemento a studi di genetica di popolazione e filogenesi.

Pertanto, sono stati scelti 3 marcatori cloroplastici (*rbcL*, *rpoC1*, *trnH-psbA*) tra quelli indicati nell'ambito della Conferenza di Taipei ed il marcatore nucleare ITS.

Le analisi condotte su questi hanno evidenziato che le regioni codificanti *rbcL* e *rpoC* mostrano un livello di polimorfismo e di divergenza molto bassi con capacità di discriminare a livello di specie che, in entrambi gli esperimenti (Clustering e Similarità) è circa del 35%, quindi assolutamente insufficiente per poter essere giudicati positivamente come potenziale barcode.

La regione cloroplastica *trnH-psbA* mostra una variabilità decisamente maggiore e quindi risulta molto interessante e promettente come regione barcode con valori di successo nel discriminare le specie, superiori al 75% .

Nella regione nucleare ITS troviamo livelli di polimorfismo e divergenza nettamente maggiori rispetto a tutti gli altri marcatori, tuttavia questo maggiore polimorfismo e variabilità, non determinano un maggiore potere discriminante rispetto alla regione spaziatrice cloroplastica e possiamo, in questo contesto, affermare che i risultati ottenuti sono identici per entrambi i marcatori.

In conclusione, questo primo approccio della tecnica barcoding alle specie italiane afferenti al genere *Acer* ha mostrato risultati incoraggianti e non ha evidenziato particolari difficoltà metodologiche prospettando quindi una possibile applicazione di questo metodo ad altre specie di interesse forestale.

Abstract

Several taxa belonging to the genus *Acer*, not only at national level, are still poorly characterized from a taxonomical point of view. Despite the applications of molecular biotechnologies, such as DNA sequencing, have now been acquired as an usual analytic tool in identification of animal and vegetal species, there are no previous studies about the genetic characterization of genus *Acer* both in nationwide and worldwide.

In this context, the technique of DNA barcoding was applied to evaluate this methodology as *Acer* taxonomic tool and as a complement to studies of population genetics and phylogeny. Therefore, were selected 3 chloroplast markers (*rbcL*, *rpoC1*, *trnH-psbA*) among those suggested by the Conference of Taipei and the nuclear ITS (Internal Transcribed Spacer, ribosomal region) marker.

The analysis conducted by use of these markers showed that the coding regions *rbcL* and *rpoC* display a low level of polymorphism and divergence; this resulted in a very low capacity of discriminating the different species both with Clustering and in Similarity methods.

This implies that the two regions seem to be less important as potential useful barcode markers.

The region *trnH-psbA* chloroplast variability is much greater than previouses and therefore it is very interesting and promising as a barcode region with values of success in discriminating species, exceeding 75%.

The nuclear ITS region shows polymorphism and divergence levels much higher than all other markers, however, this elevated polymorphism and variability were not able to discriminate better than the space chloroplast region (*trnH-psbA*).

It is possible to assert that the results obtained are the same for both markers.

In conclusion, this first approach to the barcoding species which belong to the Italian wild maples showed encouraging results and highlighted speed, repeatability and facility for a routine application of this method.

In force of the results here presented on *Acer*, we advise a possible application of this method to all other species of wild Italian dendroflora.

**La biosistemica molecolare del genere *Acer*: applicazione del metodo barcoding alle
specie italiane**

INDICE

1. SCOPO DEL LAVORO	9
2. INTRODUZIONE AL GENERE ACER	
2.1 Ricognizione storica dei sistemi di classificazione	11
2.2 La tassonomia degli aceri	11
2.3 La vegetazione forestale in Italia	14
2.3.1 La paleoecologia	14
2.3.2 Le glaciazioni	15
2.3.3 Attuale distribuzione dei boschi italiani	16
2.4 Breve storia del nome <i>Acer</i>	17
2.5 L'habitat nativo del genere <i>Acer</i> a la sua distribuzione	18
2.6 Le caratteristiche morfologiche ed ecologiche del genere <i>Acer</i>	20
2.7 L'importanza, l'impiego e la produttività dell' <i>Acero</i>	21
2.7.1 Il legno di <i>Acero</i>	21
2.7.2 Il miele di <i>Acero</i>	21
2.7.3 Lo sciroppo di miele d' <i>Acero</i>	22
2.7.4 L'impiego degli aceri nella costruzione del paesaggio	22
2.7.5 Estratti naturali	22
2.8 L'evoluzione del genere <i>Acer</i>	23
2.8.1 Paleobotanica ed evoluzione degli aceri	23
3. GLI ACERI NEL MONDO	25
3.1 Lo stato dell'arte nella tassonomia	25
4. GLI ACERI IN ITALIA	26
4.1 <i>Acer pseudoplatanus</i> L	26
4.1.1 I sinonimi	26
4.1.2 Tipo	26
4.1.3 I nomi comuni	26
4.1.4 La morfologia	26
4.1.5 L'areale	33
4.1.6 La storia	35
4.1.7 L'ecologia	35
4.1.8 Il numero cromosomico	36
4.1.9 Subspecie	36
4.1.10 L'importanza	36
4.2 <i>Acer monspessulanum</i> spp. <i>monspessulanum</i> L	37
4.2.1 I sinonimi	37
4.2.2 Tipo	37
4.2.3 I nomi comuni	37
4.2.4 La morfologia	38

4.2.5 L'areale.....	41
4.2.6 La storia.....	42
4.2.7 L'ecologia.....	43
4.2.8 Il numero cromosomico.....	43
4.2.9 Le sottospecie.....	43
4.2.10 L'importanza.....	45
4.3 <i>Acer opalus</i> spp. <i>obtusatum</i> L.....	46
4.3.1 I sinonimi.....	46
4.3.2 Tipo.....	46
4.3.3 I nomi comuni.....	46
4.3.4 La morfologia.....	46
4.3.5 L'areale.....	49
4.3.6 La storia.....	50
4.3.7 L'ecologia.....	50
4.3.8 Il numero cromosomico.....	51
4.3.9 Le sottospecie.....	51
4.3.10 L'importanza.....	51
4.4 <i>Acer opalus</i> spp. <i>opalus</i> L.....	52
4.4.1 I sinonimi.....	52
4.4.2 Tipo.....	52
4.4.3 I nomi comuni.....	52
4.4.4 La morfologia.....	52
4.4.5 L'areale.....	56
4.4.6 La storia.....	57
4.4.7 L'ecologia.....	57
4.4.8 Il numero cromosomico.....	57
4.4.9 Altre sottospecie.....	57
4.4.10 L'importanza.....	58
4.5 <i>Acer campestre</i> L.....	59
4.5.1 I sinonimi.....	59
4.5.2 Tipo.....	59
4.5.3 I nomi comuni.....	59
4.5.4 La morfologia.....	59
4.5.5 L'areale.....	63
4.5.6 La storia.....	64
4.5.7 L'ecologia.....	65
4.5.8 Il numero cromosomico.....	67
4.5.9 Le sottospecie.....	67
4.5.10 L'importanza.....	67
4.6 <i>Acer platanoides</i>	68
4.6.1 I sinonimi.....	68
4.6.2 Tipo.....	68
4.6.3 I nomi comuni.....	68
4.6.4 La morfologia.....	68

4.6.5 L'areale.....	73
4.6.6 La storia.....	74
4.6.7 L'ecologia.....	74
4.6.8 Il numero cromosomico.....	75
4.6.9 Le subspecie.....	75
4.6.10 L'importanza.....	75
 4.7 <i>Acer cappadocicum</i> ssp. <i>lobelii</i> Ten.....	76
4.7.1 I sinonimi.....	76
4.7.2 Tipo.....	76
4.7.3 I nomi comuni.....	76
4.7.4 La morfologia.....	77
4.7.5 L'areale.....	79
4.7.6 La storia.....	80
4.7.7 L'ecologia.....	80
4.7.8 Il numero cromosomico.....	80
4.7.9 L'importanza.....	80
 4.8 <i>Acer peronai</i> Ten.....	81
4.8.1 I sinonimi (<i>A. x Martinii</i> Jordan).....	81
4.8.2 Tipo.....	81
4.8.3 I sinonimi (<i>A. x coriaceum</i>).....	81
4.8.4 L'epiteto.....	81
4.8.5 La morfologia.....	81
4.8.6 L'areale.....	83
4.8.7 La storia.....	84
4.8.8 L'ecologia.....	84
4.8.9 L'importanza.....	85
 4.9 <i>Acer negundo</i>	86
4.9.1 I sinonimi.....	86
4.9.2 Tipo.....	86
4.9.3 I nomi comuni.....	86
4.9.4 La morfologia.....	86
4.9.5 L'areale.....	89
4.9.6 La storia.....	90
4.9.7 L'ecologia.....	91
4.9.8 Numero cromosomico.....	91
4.9.9 Subspecie.....	91
4.9.10 L'importanza.....	91
Chiave per la determinazione degli aceri italiani.....	92
 5. LA SISTEMATICA E LA GENETICA	93
5.1 La classificazione scientifica.....	93
5.2 La sistematica molecolare.....	94
5.3 I genomi vegetali.....	95
5.4 Gli strumenti della sistematica molecolare.....	96
5.4.1 La PCR. La Reazione a Catena della Polimerasi.....	96
5.4.2 Generare i dati molecolari.....	97

5.4.2.1 La mappatura genica.....	97
5.4.2.2 Sequenziare i geni.....	97
5.5 Il DNA barcoding.....	98
6. MATERIALI E METODI PER LE ANALISI MOLECOLARI.....	101
6.1 Individuazione delle popolazioni.....	101
6.2 La scelta dei marcatori molecolari.....	102
6.3 Descrizione delle regioni cloroplastiche utilizzate.....	103
6.3.1 rbcL.....	103
6.3.2 rpoC.....	103
6.3.3 trnH-psbA.....	104
6.3.4 Lo spaziatore trascritto interno ribosomale ITS.....	104
6.4 La liofilizzazione del materiale.....	106
6.5 Workflow – tre livelli operativi.....	109
6.5.1 L'estrazione del DNA.....	110
6.5.2 Esame della quantità e della qualità del DNA estratto.....	111
6.5.3 Risultati della lettura con fluorimetro.....	112
6.5.4 Amplificazione del DNA cloroplastico e del DNA ribosomale.....	114
6.5.5 Il sequenziamento.....	117
6.5.6 L'analisi dei dati di sequenza.....	119
6.4.6.1 Analisi dei parametri generali di polimorfismo.....	117
6.4.6.2 La valutazione dell'efficienza dei marcatori nell'identificazione a livello di specie.....	121
7. RISULTATI DELLE ANALISI GENETICHE.....	124
7.1 Il polimorfismo di sequenza dei marcatori utilizzati nel genere <i>Acer</i>	124
7.2 Rappresentazione grafica della variabilità nucleotidica.....	125
7.3 Tabelle della Divergenza interspecifica e intraspecifica dei quattro marcatori utilizzati (trnH-psbA, rbcL, rpoC1 e ITS).....	129
7.4 Esperimento con il metodo di Similarità BLAST per ciascun marcatore. Output di ogni Query.....	137
7.5 Dendrogrammi ottenuti dall'esperimento Algoritmi Clustering.....	172
7.6 Multiallineamento della regione cloroplastica trnH-psbA.....	178
7.7 Monofilia della Sezione <i>Platanioidea</i>	181
8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	182
9. BIBLIOGRAFIA.....	186

1. SCOPO DEL LAVORO

Numerosi *taxa* ascrivibili al genere *Acer*, non solo a livello nazionale, sono ancora scarsamente caratterizzati dal punto di vista tassonomico. Molti di essi, infatti, con particolare riferimento a quelli appartenenti alla stessa Sezione, manifestano affinità non ancora chiare. Ad esempio, fenomeni come la speciazione simpatica, la presenza di specie vicarianti oltre a fenomeni di ibridazione o introgressione che si verificano con frequenza fra le specie afferenti al genere *Acer*, mettono talvolta in crisi un tipo di classificazione basata esclusivamente su criteri morfologici ed anatomici.

Pertanto in questa indagine è stata affrontata e analizzata criticamente tutta la letteratura finora prodotta per definire la tassonomia del genere *Acer* su basi morfologiche. Successivamente è apparso opportuno valutare le possibilità di applicazione di un approccio biomolecolare alla discriminazione tassonomica delle diverse specie di *Acer*.

Infatti, nonostante le applicazioni della biotecnologia molecolare, come il sequenziamento del DNA, siano state oramai acquisite come uno strumento routinario nell'identificazione delle specie sia animali che vegetali, al momento non esistono studi di questo tipo su nessuna specie afferente al genere forestale *Acer* né a livello nazionale che internazionale.

In questo contesto si è quindi pensato di applicare la tecnica del DNA barcoding per valutare le potenzialità di questa metodologia nel genere *Acer* sia come strumento tassonomico sia come complemento a studi di genetica di popolazione e filogenesi.

In particolare il presente lavoro si propone pertanto di verificare anche il successo nell'utilizzo di 4 marcatori molecolari nel discriminare le specie nazionali di *Acer*: lo spaziatore trascritto interno ribosomale ITS (Internal Transcribed Spacer) e i 3 marcatori

cloroplastici (*rbcL*, *rpoC1*, *trnH-psbA*) riconosciuti tra le sequenze indicate come DNA barcode nell'ambito della Conferenza di Taipei.

Il principale obiettivo della presente ricerca è stato quello di analizzare e valutare i fattori fondamentali per la selezione delle regioni barcode più discriminanti tra le specie di *Acer* esaminate.

Infatti l'approccio barcode si è dimostrato finora vincente per gli studi di biosistemica animale, ma pare ancora di scarsa applicabilità al mondo vegetale. La scelta dei marcatori selezionati per la seguente indagine è giustificata dalla loro ampia utilizzazione negli studi del DNA barcode, dalla loro variabilità e, quindi, dalla potenziale efficacia nell'identificazione delle specie vegetali.

2. INTRODUZIONE AL GENERE ACER

2.1 Ricognizione storica dei sistemi di classificazione.

Il genere *Acer* è stato creato da Tournefort nel 1700. Linneo (1737a) nella prima edizione di *Genera Plantarum* accettò *Acer* come un distinto genere. Nel lavoro che seguì, *Species Plantarum* (1753), egli individuò e descrisse nove specie tra le quali *A. pseudoplatanus* fu accettata come specie tipo del genere.

Il primo approccio alla categorizzazione ed alla proposta di uno schema filogenetico fu proposto comunque da Pax tra la fine dell' '800 ed i primissimi del '900. Egli, infatti, distinse 114 specie ascrivibili a 13 sezioni diverse ed ulteriormente raggruppate in quattro categorie. Questo tipo di schematizzazione fu causa di numerose diatribe scientifiche fra i maggiori botanici ed esperti del tempo in relazione soprattutto al posizionamento di *A. negundo*.

In epoca più recente, studi palinologici condotti da Muller e Leenhouts nel 1976 sottolinearono profonde affinità fra la famiglie *Ippocastanaceae*, *Aceraceae* e *Sapindaceae*. Questi Autori verificarono che per quanto riguarda gli aspetti macromorfologici non esiste una evidente separazione fra le *Sapindaceae* da una parte e le *Ippocastanaceae* e le *Aceraceae* dall'altra.

2.2 La tassonomia degli aceri.

Nonostante la ricerca abbia fornito un gran quantitativo di informazioni, numerosi *taxa* ascrivibili al genere *Acer* sono ancora scarsamente caratterizzati dal punto di vista tassonomico poiché molti di essi, principalmente quelli appartenenti alla stessa sezione, manifestano affinità non ancora chiare. Moderni studi, in particolar modo in campo biomedico, hanno consentito di chiarire alcune relazioni finora oscure, anche se di contro hanno messo in discussione altre interpretazioni fino a questo momento universalmente più accreditate. Questi nuovi metodi di ricerca hanno dimostrato oltre alla complessità del genere, anche l'inadeguatezza di un approccio esclusivamente morfologico allo studio tassonomico.

Il genere *Acer* annovera un numero di specie compreso fra 150 e 110 per la presenza di circa quaranta *taxa* insufficientemente conosciuti e di cui ancora incerta rimane la classificazione.

Le specie sono suddivise in 16 sezioni, ulteriormente suddivisibili in serie.

Sinossi tassonomica

Divisione: Embryophyta/Siphonogama

Sottodivisione: Angiospermae

Classe: Dicotyledonae

Ordine: Sapindales

Famiglia: Aceraceae Jussieu (1789, as Acera)

Genere: *Acer* L. (1753)

Sezione *Parviflora* Koidzumi (1911)

Serie *Parviflora* (Koidzumi) Pojarkova (1933)

Serie *Distila* (Ogata) Murray (1983)

Serie *Caudata* Pax (1886)

Sezione *Palmata* Pax (1885)

Serie *Palmata* Pax

Serie *Sinensia* Pojarkova (1933)

Serie *Penninervia* Metcalf (1932)

Sezione *Wardiana* (de Jong), comb. &. stat. nov.

Sezione *Macrantha* Pax (1885)

Sezione *Glabra* Pax amend. Momotani

Serie *Glabra*

Serie *Arguta* (Rehder) Rehder (1949)

Sezione *Negundo* (Boemer) Maximowicz (1880)

Serie *Negundo*

Serie *Cissifolia* (Koidzumi) Momotani (1962)

Sezione *Indivisa* Pax (1885)

Sezione *Acer*

Serie *Acer*

Serie *Monspessulana* Pojarkova (1933)

Serie *Saccharodendron* (Rafinesque) Murray (1970)

Sezione *Pentaphylla* Hu & Cheng (1948)

Serie *Pentaphylla*

Serie *Trifida* Pax (1886)

Sezione *Trifoliata* Pax (1885)

Serie *Grisea* Pojarkova (1933)

Serie *Mandshurica* Pojarkova (1933)

Sezione *Lithocarpa* Pax (1885)

Serie *Lithocarpa*

Serie *Macrophylla* Pojarkova ex Momotani (1962)

Sezione *Platanoidea* Pax (1885)

Sezione *Pubescentia* (Pojarkova) Ogata (1967)

Sezione *Ginnala* Nakai (1915)

Sezione *Rubra* Pax (1885)

Sezione *Hyptiocarpa* Fang (1966)

2.3 La vegetazione forestale in Italia.

2.3.1 La paleoecologia

I più antichi reperti fossili relativi allo sviluppo forestale sul territorio nazionale risalgono al Paleozoico, da 542 a 251 milioni di anni fa, rinvenuti sui rilievi delle Alpi Carniche e descrivono un ambiente tropicale con felci arborescenti (Pignatti, 1998). Ne sono testimonianza reperti di pteridofite del Permiano (300-235 milioni di anni fa), rappresentanti delle grandi felci arboree che hanno costituito le foreste del Carbonifero e Permiano a livello mondiale. Alcuni esemplari di grandi felci potevano raggiungere i venti metri d'altezza. Tali dimensioni erano rese possibili da tronchi dotati di capaci canali vascolari che permettevano il trasporto efficace della linfa alla sommità della pianta.

Al Mesozoico (da 25 a 65 milioni di anni fa) risale la formazione delle Dolomiti così come la comparsa delle Gimnosperme; in seguito sono emerse le Alpi e successivamente gli Appennini con alcune testimonianze di flora subtropicale confrontabile a quella che attualmente si sviluppa in Cina meridionale o in Florida.

Durante il Messiniano (da 6 milioni a circa 0,02 milioni di anni fa) tutto il bacino del Mediterraneo ha subito un progressivo processo di desertificazione; la vegetazione forestale era limitata ai rilievi di maggior quota (Bertolani e Marchetti D., 1985) ospitanti consorzi di pini mediterranei e boschi montani sempreverdi a tasso e agrifoglio (*Ilex e Taxus*).

Nel periodo successivo il clima italiano è tornato progressivamente più umido, la vegetazione ha nuovamente assunto un carattere subtropicale con l'alternarsi di foreste sempreverdi e savane. Tale alternanza è perdurata fino al Pliocene (2-3 milioni di anni fa) quando il quadro vegetazionale presentava le caratteristiche che assume attualmente. Durante questo periodo dell'era Cenozoica era possibile distinguere diverse fasce di vegetazione forestale: "lungo la costa si sviluppa la macchia sempreverde in cui si distingue una quercia molto simile al leccio" (Bertoldi, 1985), "mentre verso l'interno si riscontra una foresta decidua di rovere, frassino, carpino, olmo, faggio, castagno ed altre specie tipiche di un clima temperato che oggi è possibile riconoscere solo in nordamerica o in Cina" (Bertolani *et al.* 1979). Sono ascrivibili a questo periodo i ritrovamenti fossili di foresta a *Taxodium* rinvenuti presso Acquapendente, oggi riscontrabile solo in Florida.

Alla fine del Pliocene il clima era ancora tipicamente subtropicale o mediterraneo caldo.

2.3.2 Le glaciazioni

E' nel Pleistocene (da 1,8 milioni di anni fa a 11.000 anni fa) che il clima si raffredda e compaiono i primi ghiacci che scendono anche fino alla pianura formando gli anfiteatri morenici che oggi conosciamo. Inizia così il fenomeno delle glaciazioni, fasi che durano anche decine di migliaia di anni. Si distinguono quattro glaciazioni principali: Günz, Mindel, Riss e Würm. Esistono diverse teorie di interpretazione delle glaciazioni: la più accreditata riconosce nella glaciazione la condizione termica normale del pianeta (Lovelok, 1988), mentre i periodi di innalzamento termico, le interglaciazioni, come quella che stiamo vivendo, costituiscono delle fasi momentanee di intervallo.

Grazie all'analisi di depositi pollinici fossili è possibile formulare ipotesi sufficientemente accreditate dell'assetto forestale italiano: sulla catena alpina la vegetazione era limitata ai rilievi prealpini dove si sviluppavano chiari boschi di larice (*Larix decidua*, Mill. 1768). Subito a sud, in pianura padana, era possibile trovare vegetazione a pino silvestre (*Pinus sylvestris* L., 1753) alternato a betulla (*Betula spp.*) e torbiere. I popolamenti appenninici presentavano una maggiore complessità e ricchezza con quercia (*Quercus spp.*), acero (*Acer spp.*), faggio (*Fagus sylvatica*), abete bianco (*Abies alba*) e artemisia (*Artemisia absinthium*) nelle steppe più elevate. L'abete rosso (*Picea abies*, H. Karst. 1881) era presente in popolamenti limitati nell'Appennino settentrionale e centrale. Con l'ultima culminazione fredda, databile circa a 20000 anni fa, il pino silvestre e la betulla ricoprivano la pianura padana. Circa 2000 anni dopo, in seguito alla fusione della calotta alpina, i ghiacciai si ritirarono lasciando spazio sulle Alpi venete e tridentine alla prima colonizzazione ad opera di pino silvestre e pino cembro (*Pinus cembra*, L. 1753); successivamente, nella fascia superiore, da Est verso Ovest, si estese l'abete rosso ed il querceto misto in quella inferiore. In seguito si espanse l'abete bianco proveniente da sud; ultimo a conquistare ampiamente il territorio fu il faggio che ebbe la sua massima diffusione circa 5000 anni fa, mentre nella pianura il bosco misto di farnia e carpino sostituì le pinete.

Nel periodo successivo, circa 2000-3000 anni a.C., in tutta l'Italia settentrionale e in Europa occidentale il clima temperato consentì al leccio di raggiungere verso sud le zone pedocollinari.

Negli ultimi 2000 anni i parametri climatici non hanno subito particolari variazioni.

2.3.3 Attuale distribuzione dei boschi italiani.



Fig. 1. L'attuale distribuzione dei boschi italiani

■ **Boschi dell'ambiente mediterraneo** *Pinus pinea*, *Pinus pinaster*, *macchia mediterranea*, *Arbutus unedo*, *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, *Quercus pubescens*, *Quercus suber*, *Cupressus sempervirens*.

■ **Boschi dell'ambiente planiziario e siepi campestri** *Quercus robur*, *Carpinus betulus*, *Ulmus minor*, *Fraxinus excelsior*, *Tilia platyphyllos*, , *Acer platanoides*. *Pioppo*, *salice*, *Platano*, *olmo campestre*, *Betulla*, *Acer campestre*, *Robinia pseudoacacia*, *Morus spp.*, *Cornus mas*, *Frangola alnus*, *Cornus sanguinea*, *Sambucus nigra*, *Corylus avellana*.

■ **Boschi dell'ambiente fluviale** *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Salix alba*.

■ **Boschi dell'ambiente collinare** *Ostrya carpinifolia*, *Castanea sativa*, *Quercus cerris*, *Fraxinus ornus*, *Quercus*, *Quercus pubescens*, *Tilia cordata*.

■ **Boschi dell'ambiente montano** *Abies alba*, *Acer pseudoplatanus*, *Fagu*, *Betula*, *Ulmus glabra*, *Pinus nigra*, *Populus tremula*, *Taxus baccata*.

■ **Boschi dell'ambiente alpino** *Picea excelsa*, *Betulla pendula*, *Larix decidua*, *Pinus cembra*, *Pinus montana*, *Pinus sylvestris*.

2.4 Breve storia del nome *Acer*

La parola *Acer* deriva dal Proto-Indo-Europeo *Ac*, che significa acuto, aguzzo, affilato, o affilare. La parola *Ac* si trova in numerose parole greche e latine come *acropolis*, *akouo*, *acutus*, *acacia*, *aculeata* ed altre (Oterdoom, 2001)

L'associazione della parola *Ac* con il genere *Acer* deriva dalla foglia appuntita associata al genere, un carattere che si riflette anche nel sinonimo tedesco. In Russia gli aceri prendono il nome di Spitzblatt che significa appunto “foglia appuntita”. Nel 1838 Loudon propone una diversa spiegazione di come il termine *Ac* diventi poi *Acer*; egli infatti sottolinea che il legno di Acero è estremamente duro così da essere utilizzato per la realizzazione di puntali e lance. Così il genere prende il nome dalla forma di tali strumenti. Il nome comune tedesco con cui si indica un popolamento di acero è *Spanse aak* dove non solo è possibile rintracciare la stessa radice *ac*, ma risulta anche facile individuare l'intima analogia con la parola inglese *oak* che tuttavia indica un genere diverso di alberi (*Quercus*).

E' interessante notare che in latino la parola *Acer* è presente in una forma neutra a differenza di quanto accade per i nomi di alberi che sono sempre al femminile.

In *Hortus Cliffortianus*, pubblicato nel 1737 Linneo trattò quattro specie di *Acer*:

- Acer majus*
- Acer platanoides*
- Acer campestre*
- Acer maximum*

Tuttavia il termine scientifico *Acer* fu ufficialmente assegnato al genere da Linneo solo nel 1753 in *Species Plantarum* (1753).

Tra il 1737 ed il 1753 Linneo aggiunse alla letteratura botanica altre nove specie appartenenti al genere *Acer*.

2.5 L'habitat nativo del genere *Acer* e la sua distribuzione

Nativo dell'emisfero boreale, probabilmente nelle province cinesi di Sichuan, Yunnan e Hubei, l'Acero è ben inserito nel clima temperato del Nord America e dell'Eurasia e nella fascia intertropicale nel sudest asiatico (Fig. 2 e Tavola 1). “Ampiamente distribuito, ma in nessun luogo abbondante” (van Gelderen *et al.* 1994): questa condizione si verifica in ogni parte dell'areale di diffusione del genere *Acer*, il quale ha fatto registrare un periodo di massima diffusione nel Miocene (da 24 a 5 milioni di anni fa).

Allo stato attuale il genere *Acer* è diffuso nelle foreste dell' Europa, dell'America boreale e dell'Asia temperata.

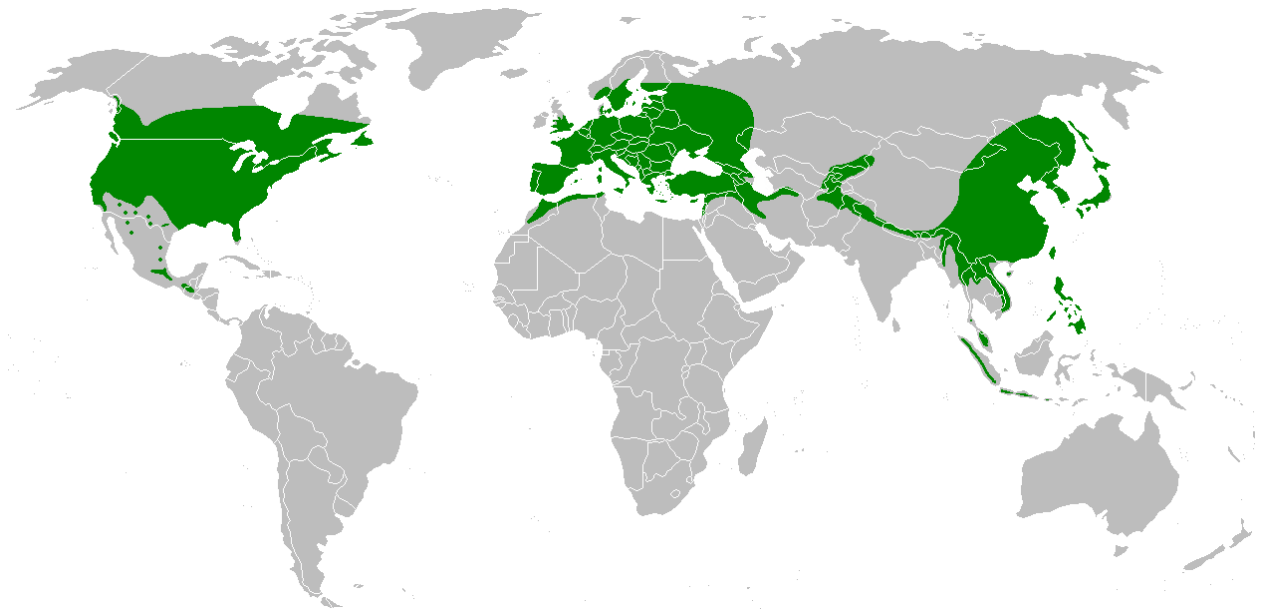


Fig. 2. Attuale distribuzione del genere *Acer* nell'emisfero boreale.

La sympatria che caratterizza il genere *Acer* condiziona la distribuzione geografica delle specie afferenti a questo genere. In base a questa proprietà infatti specie diverse vivono nello stesso areale senza ibridarsi. Ne sono esempio popolazioni di *A. saccharum* e di *A. rubrum* che convivono su areali molto ampi pur rimanendo riproduttivamente distinte (Stebbins, 1977); analogo comportamento si verifica fra due specie europee come *A. pseudoplatanus* e *A. platanoides*. L'assenza di ibridi fra queste due coppie è significativa ed è giustificata dal diverso periodo di fioritura.

Altra caratteristica del genere *Acer* è la marcata tendenza ad avere “specie vicarie”. Questo fenomeno risulta evidente quando popolazioni che occupano aree separate sono discendenti da un diretto progenitore comune ma sono immediatamente distinguibili da caratteri fenotipici

tanto da essere considerate specie diverse dai sistematici. Questo tipo di affinità è riscontrabile ad esempio fra l'*A. platanoides* europeo e quello dell'Asia minore e tra l'*A. cappadocicum* in Turchia orientale il quale in Cina è *A. cappadocicum* ssp. *sinicum*.

2.6 Le caratteristiche morfologiche ed ecologiche del genere *Acer*

Tutte le specie di *Acer* sono legnose: sono presenti sia specie arbustive sia piante delle più grandi dimensioni come l'*Acer* dell'Oregon (*A. macrophyllum*), l'*A. pseudoplatanus* nell'Europa centrale e l'*A. velutinum* nella parte più a est del Caucaso e nel nord-ovest iraniano. Nel Veda, un'antichissima raccolta di opere sacre di estrema importanza presso la religione induista, queste specie sono ricordate per le enormi dimensioni con altezze anche superiori ai 37-40 m e foglie più ampie di 30 cm.

La maggior parte degli aceri è decidua anche se esistono alcune specie sempreverdi.

I fiori sono piccoli e riuniti in pannocchie, ombrelle, racemi o corimbi, actinomorfi, molto spesso andromonoici o dioici; i sepali sono generalmente presenti in numero di quattro o cinque anche se in alcune specie possono anche essere del tutto assenti. Gli stami, mediamente in numero di otto, possono ridursi fino a quattro o aumentare a dodici, sono posizionati al di sopra di un caratteristico disco nettario di forma anulare o lobata che costituisce un fattore diagnostico nel processo evolutivo di questo genere.

La contenuta produzione di granuli pollinici, solo 1000 per ogni fiore, giustifica l'impollinazione zoofila a differenza di altri generi come *Betula*, *Quercus*, *Populus*, *Fraxinus* e *Ulmus* che, vantando produzioni polliniche almeno dieci volte superiori, si avvalgono di quella anemofila. La quantità relativamente piccola di polline prodotto è una delle ragioni per cui il polline di *Acer* sia così infrequente nei rilevamenti microfossili.

In linea generale gli aceri manifestano la maturità fiorale più precocemente rispetto alle querce e ai faggi, ma esiste una notevole differenza nell'epoca di fioritura fra individui appartenenti a sezioni differenti.

L'ovario, supero e bicarpellare può talvolta presentare anche tre carpelli portando in questo caso alla formazione di tre samare; in ciascun carpello sono contenuti due ovuli, anche gli stili sono due. Tuttavia frequentemente si riscontrano fiori unisessuali ginomonoici o andromonoici. L'impollinazione è generalmente entomofila.

Il frutto è una samara alata accoppiata. Per la particolare conformazione dei frutti la disseminazione è anemocora.

In genere i semi degli aceri sono dormienti; fanno eccezione le due specie nordamericane *A. saccharinum* e *A. rubrum*.

Il numero cromosomico di base per tutta la famiglia è 13 anche se si riscontrano casi di poliploidia (Gellini e Grossoni, 1997) come *A. pseudoplatanus* e *A. saccharinum* che presentano tetraploidia ($2n=52$).

La foglia è semplice, lungamente picciolata, frequentemente palminervia, variamente cordata alla base, lobata e caduca; il numero dei lobi può essere limitato a 3 come in *A. monspessulanum* o arrivare fino a 11 come in *A. japonicum* e *A. palmatum*; talvolta è possibile trovare foglie palminervie ma non lobate o penninervie.

Il ritidoma ha un aspetto che differisce fra le specie: liscio in *A. lobelii*, caduco in placche in *A. platanoides* o anche colorato in riccioli come *A. griseum* della Cina centrale o *A. capillipes* del Giappone. Questo genere presenta gemme opposte, riccamente rivestite di perule di cui, le più interne, possono differenziare al loro apice una piccola foglia.

La ramificazione è monopodiale e opposta.

2.7 L'importanza, l'impiego e la produttività dell'Acero

I caldi colori accesi in grado di infiammare ed ornare i paesaggi non costituiscono l'unica giustificazione all'introduzione della coltivazione di diverse specie di *Acer*. Esistono infatti anche dei risvolti produttivi legati alla coltivazione del suddetto genere di piante forestali e relativi alla produzione di legno, di miele, di sciroppo ed estratti naturali.

2.7.1 Il legno di Acero

Il legno degli aceri è un tipico alburno, privo di tannini. Per questo la produzione legnosa risulta più facilmente putrescibile quando rimane lungamente a contatto con il suolo o con l'acqua. Virgilio descrive nell'Eneide come sia proprio il legno di acero ad essere impiegato per la costruzione del cavallo di Troia. Ancora oggi il legno di *A. saccharum* risulta essere il più ampiamente utilizzato per la realizzazione di pavimenti e pareti domestici, pavimenti per palestre e corridoi da bowling e così via. *A. macrophyllum*, *A. rubrum* e *A. saccharinum* producono un legno morbido utilizzato per la realizzazione di utensili da cucina; il legno dell'*A. pseudoplatanus*, senza dubbio vanta un più nobile impiego nella costruzione dei violini.

2.7.2 Il miele di Acero

Numerose specie di Acero sono menzionabili per la produzione di miele caratterizzato da un colore debolmente ambrato e da una grana fine. Notevoli risultano le produzioni di miele che si attestano su valori di 500 kg ha⁻¹.

2.7.3 Lo sciroppo di miele d'Acero

La produzione di sciroppo di miele d'Acero, ampiamente diffusa in tutto il mondo, trae origine dalle popolazioni indigene americane. Appena estratta dall'acero, la linfa ha un colore chiaro e non risulta particolarmente dolce, oscillando il suo contenuto zuccherino mediamente fra 1% e 3%. Lo sciroppo d'acero è un liquido zuccherino ottenuto bollendo la linfa dell'*A. saccharum* e dell'*A. nigrum*. È il dolcificante naturale meno calorico (circa 250 calorie per cento grammi) dopo la melassa; ha un alto contenuto di sali minerali.

2.7.4 L'impiego degli aceri nella costruzione del paesaggio

Come in ogni altra attività umana, l'aspetto condiziona ampiamente l'utilizzo di alcune specie arboree e non altre nella costruzione del paesaggio. Gli individui appartenenti a questo genere presentano una grande variabilità di caratteri apprezzabili adattandosi bene anche a situazioni ambientali molto differenti tra loro: giardini pubblici e privati, alberature stradali, ambienti molto freddi o molto caldi, molto secchi o molto umidi e condizioni pedologiche difficili.

2.7.5 Estratti naturali

Alcuni prodotti biochimici estratti dagli aceri ricoprono una discreta importanza nella lotta agli insetti fitofagi fungendo da repellenti nei confronti di termiti xilofaghe.

Aprè, inoltre, interessanti prospettive l'impiego di estratti da *A. negundo* negli interventi chemioterapici nella lotta ai tumori.

2.8 L'evoluzione del genere *Acer*

2.8.1 Paleobotanica ed evoluzione degli aceri

A causa della facile deperibilità sia del legno che della parete pollinica del genere *Acer*, è stato finora difficile, più di ogni altro genere forestale, condurre un'esaustiva ricerca paleobotanica sugli aceri. Pur tuttavia le rare repertazioni fossili, sono risultate particolarmente preziose nel ricostruire l'evoluzione degli aceri ed il loro rapporto filogenetico.

Il primo significativo contributo su questo argomento è stato fornito da Pax (1885, 1886); più recentemente, con particolare riferimento ai fossili europei, Walther (1972) ha ampliato lo stato delle conoscenze in questo senso. Il genere *Acer* si originò circa 67 milioni di anni fa nel centro-ovest della Cina, nelle attuali province di Hubei, Sichuan e Yunnan e cominciò a diffondersi ampiamente alla fine dello stesso periodo. L'Asia ed il Nord America erano unite all'altezza dell'attuale stretto di Bering, la temperatura media era più alta, le regioni polari erano temperate e non esistevano zone di ghiaccio perenne. La presenza di numerosi mari interni poco profondi e la maggior estensione degli oceani garantivano un clima mite. La facile diffusione di queste piante fu consentita non solo dalle favorevoli condizioni climatiche e geografiche, ma anche dalla loro elevata capacità di dispersione grazie anche ad efficienti dispersori ed impollinatori.

Nel Pliocene, quando la terra cominciò a raffreddarsi gli aceri scomparvero dall'area circumpolare circoscrivendosi alle attuali aree temperate.

Conoscendo questa espansione vegetativa, è possibile interpretare le evidenti affinità floristiche e paleofloristiche tra la regione più orientale dell'Asia ed il Nord America come, per primo, ha fatto Halenius nel 1750.

La ricerca ha consentito così di individuare alcune specie strettamente correlate e fortemente somiglianti ma rilevabili in territori attualmente separati ma un tempo uniti; ne sono esempio *A. caudatum* spp. *ukurunduense* nel nord del Giappone, in Manciuria e nel sud del Kuriles ed il corrispondente americano *A. spicatum*; la prima è considerata una varietà botanica o una forma della seconda. Citiamo anche *A. pensylvanicum* nell'est del Nord America, strettamente affine ai giapponesi *A. capillipes* e a *A. rufinerve*. L'unica differenza fra quest'ultimo e *A. pensylvanicum* è il colore autunnale delle foglie (alcuni studiosi le considerano specie conspecifiche). E' possibile citare molti altri esempi di specie conspecifiche, come il nordamericano *A. negundo* e le asiatiche *A. henryi* della Cina centrale e *A. cissifolium* o come l'americano *A. rubrum* e *A. pycnanthum*, confinato nell'isola di Honshu le quali, nonostante siano separate da diverse migliaia di chilometri, molto difficilmente sono distinguibili e riconoscibili come due specie separate.

I ritrovamenti fossili più antichi appartengono alla flora nordamericana del Cretaceo superiore, in particolare nei suoli argillosi di Amboy. I reperti fossili di *Acer* più antichi rinvenuti in Europa appartengono a *A. haselbachensis* (38 milioni di anni fa).

Secondo Firsov (1982), il genere *Acer* si sarebbe originato nella Cina centrale e in quella sud-occidentale e precisamente nelle attuali province di Hubei, Sichuan e Yunnan; da tale sito di origine *Acer* si sarebbe irradiato nelle tre principali direzioni di seguito descritte:

- verso ovest lungo la catena Himalaiana attraverso la Persia, l'Afganistan e l'Asia minore, fino a raggiungere i Balcani e l'Europa;
- verso sud attraverso l'Indocina, la Malesia, l'Indonesia e le Filippine;
- verso nord-est, in Manciuria, Corea, Giappone, e verso la Siberia dell'est fino ad attraversare lo Stretto di Bering e a diffondersi in Groenlandia e Islanda.

Il genere *Acer* raggiunse il massimo della sua diffusione nel Miocene quando era ampiamente rappresentato non solo per il numero di individui e di specie che lo componevano, ma anche per la sua estesa distribuzione che, a seguito delle glaciazioni del Pleistocene, subì una contrazione, in particolar modo in Europa. Nel nord America il genere fu spinto verso sud dando origine all'attuale popolamento isolato presente in Guatemala.

Gli studi paleobotanici effettuati da Pax (1885), Koidzumi (1911), Pojarkova (1933) e Walther (1972) hanno dimostrato che nel periodo compreso fra l'oligocene e il pleistocene si sono verificate le seguenti variazioni morfologiche ed ecologiche: la variazione dell'inserzione degli stami sul disco florale, il progressivo passaggio dalla monoicità alla dioicità, dall'impollinazione zoofila a quella anemofila e da una forma fogliare trilobata a quella pentalobata. Queste modifiche rappresentano significativi strumenti di valutazione filogenetica.

3. GLI ACERI NEL MONDO

3.1 Lo stato dell'arte nella tassonomia

Le relazioni tassonomiche all'interno del genere *Acer* sono state studiate ed individuate fino ad ora esclusivamente su base morfologica ed anatomica.

van Gelderen, de Jong e Oterdoom nella loro recente opera *Maples of the World*, pubblicato nel 1994, hanno ripercorso dettagliatamente lo studio tassonomico già elaborato in passato da diversi botanici ed hanno fornito una descrizione dettagliata di tutte le specie, sottospecie e varietà del genere *Acer* rinvenute nell'emisfero boreale e da loro divise, esclusivamente su base morfologica, in 16 Sezioni di cui 8 Sezioni sono ulteriormente suddivise in 19 Serie.

Le Sezioni e Serie comprendono 230 *taxa* di cui 124 specie, 95 sottospecie, 11 tra varietà e forme.

Tuttavia numerosi *taxa* ascrivibili al genere *Acer* sono ancora scarsamente caratterizzati dal punto di vista tassonomico, in particolare *taxa* afferenti alla stessa Sezione.

4. GLI ACERI IN ITALIA

4.1 *Acer pseudoplatanus* L. (1753)

Sezione Acer

4.1.1 I sinonimi

- A. *montanum* Garsault (1764)
- A. *opulifolium* Thuillier (1799), non Villars (1786)
- A. *procerum* Salisbury (1796)
- A. *ramosum* Schwerin (1895)
- A. *platanophyllum* St. Lager ex Keegan (1909)

4.1.2 Tipo

LINN 1225.5; LINN. “*Habitat in Helvetiae, Austrie montanis*”.

4.1.3 I nomi comuni

Sicomoro, Acero di monte, Acero bianco, Acerofico, Loppone, Agare, Platano falso.

4.1.4 La morfologia

Albero di grandi dimensioni con un’ampia e talvolta irregolare corona fino a 30 metri di altezza; i giovani rami di colore dal verde al grigio bruno presentano verdi gemme (Fig. 3). Le perule delle gemme sono verdastre; le gemme laterali sono divaricate.

Il fusto è dritto e cilindrico. La corteccia grigiastra con sfumature rossastre e striature longitudinali; è liscia nei soggetti giovani, poi si desquama in placche irregolari e sottili in quelli più adulti (Fig. 4).

Le foglie (Fig. 5), cuoriformi alla base (a) e con margine denticolato (b), sono di dimensioni variabili dagli 8 ai 15 cm di ampiezza e sono provviste di tre o cinque lobi di forma ovata (c), da acuta ad ottusa; di color verde scuro, grigio oliva sulla pagina superiore, da rossastre a grigio glauchescenti in quella inferiore (Fig. 6), presentano nervature spesso pubescenti e una base cordata. I piccioli sono di lunghezza variabile da 6 a 15 cm, 1-1,5 volte la lamina fogliare, spesso rossastri, allargati alla base e scanalati (Fig. 5 d).



Fig. 5. (a) Base fogliare cuoriforme; (b) margine fogliare denticolato; (c) lobi fogliari di forma ovata; (d) piccioli di lunghezza variabile, (e) piccioli allargati alla base.

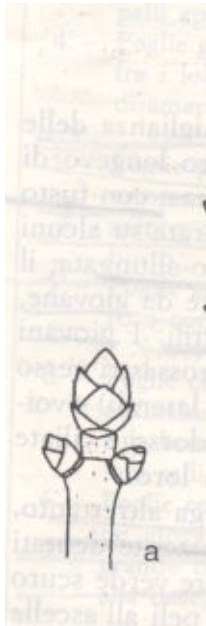


Fig. 3. a) e b) gemme laterali divaricate in *Acer pseudoplatanus*



Fig. 4. *A. pseudoplatanus* (a) Corteccia in individuo giovane; (b) Corteccia in individuo adulto.



Fig. 6. Foglia di *A. pseudoplatanus*. Pagina inferiore rossastra.

L'infiorescenza è racemoso-paniculata, terminale, con peduncoli di 10-15 cm, compare dopo la formazione delle foglie (Fig. 7).

I fiori sono pentameri (K 5, C 5, A 5, G (2)) di color giallo-verde (Figg. 9 e 9 bis) e monoici, ma spesso unisessuali. In tal caso è possibile trovare sia fiori maschili che femminili sulla stessa infiorescenza; i fiori femminili sono localizzati alla base mentre quelli maschili nella parte apicale dell'infiorescenza. I petali sono cinque, lunghi 4-5 mm; gli stami sono 8 inseriti sul margine interno del disco (Fig. 8). L'antesi è concentrata nei mesi di aprile e maggio (Fig. 14 c). L'impollinazione è entomofila.

I frutti sono samare di circa 5 cm di lunghezza, ben sviluppate e disposte ad angolo retto o a V tra loro (Figg. 10 e 11).



Fig. 7. Infiorescenze racemoso-paniculate di *A. pseudoplatanus*

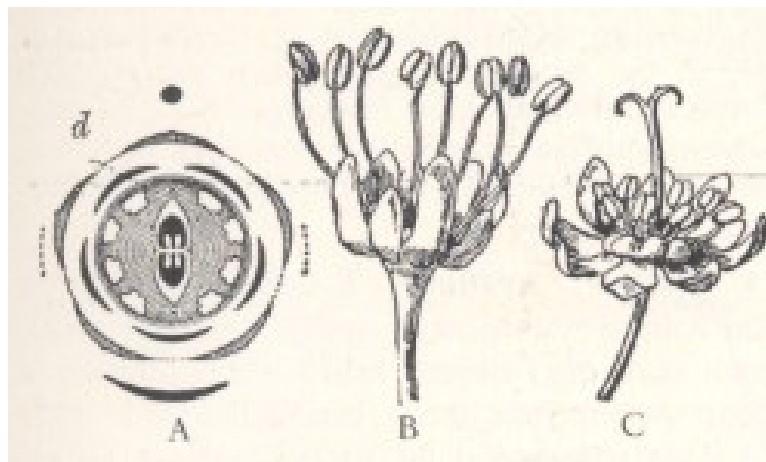


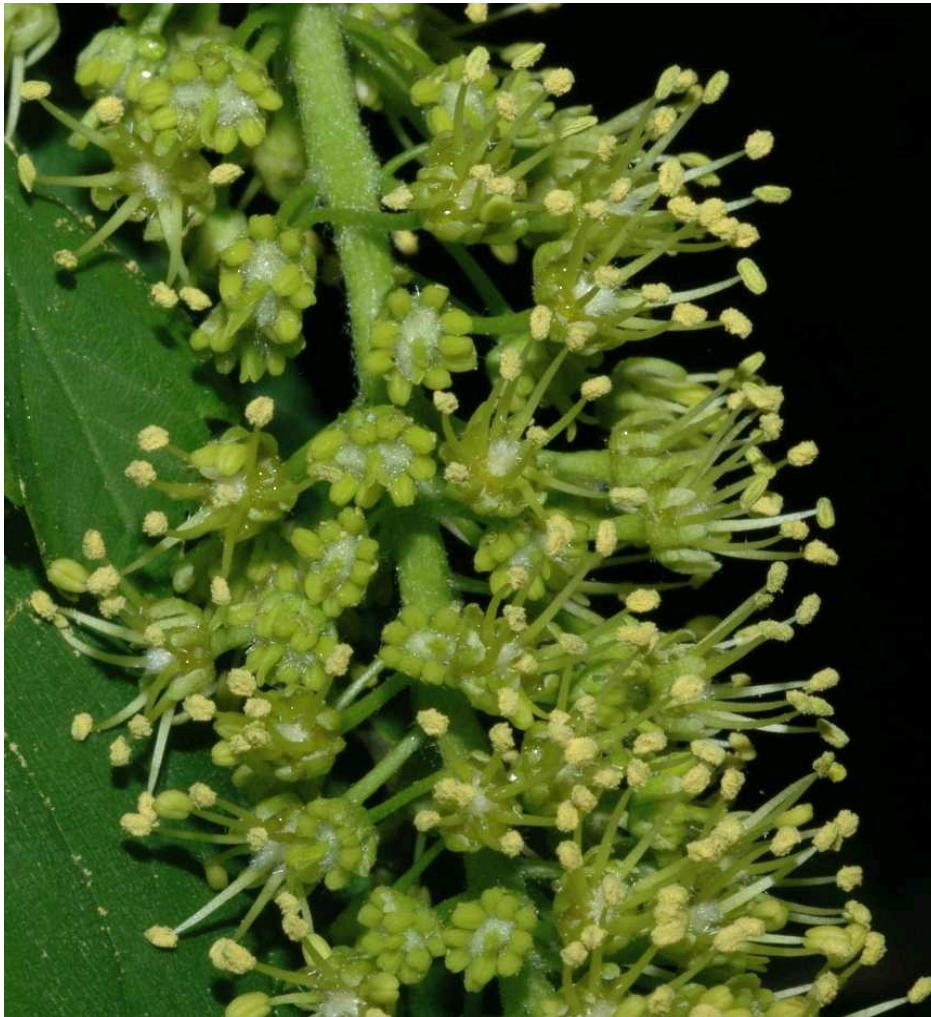
Fig. 8. Fiore di *Acer pseudoplatanus*. A. diagramma del disco florale. B Fiore maschile. C. Fiore femminile (circa 2 x). (Foto Strasburger).



Fig. 9



Fig. 9 bis



Figg. 9 e 9 bis. Fiori pentameri e monoici di *A. pseudoplatanus*



Fig. 10

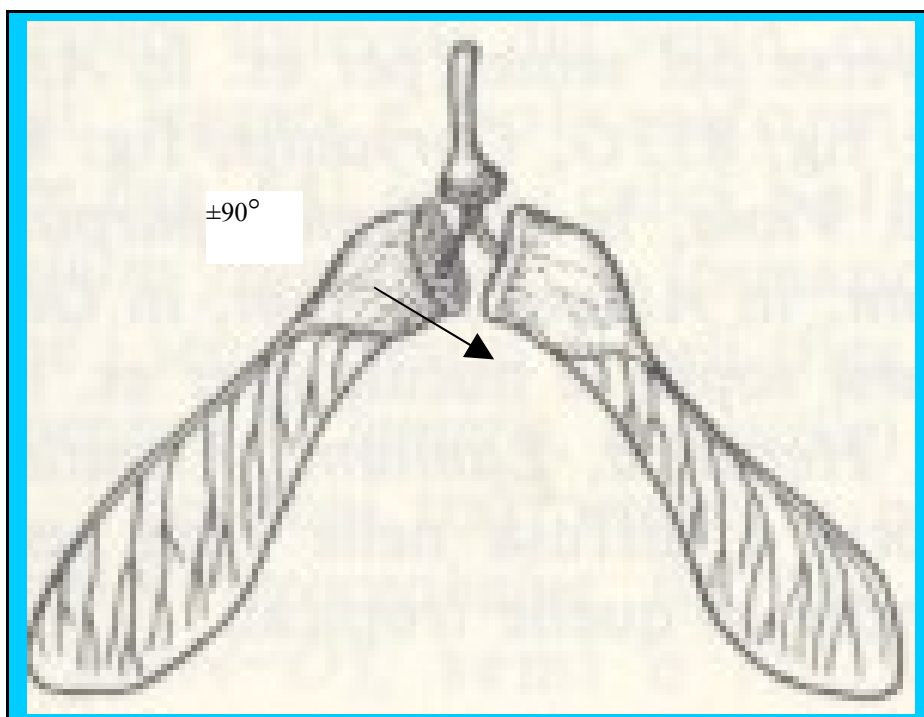


Fig. 11

Figg. 10 e 11. Samare di *A. pseudoplatanus* ben sviluppate e disposte a V (a).



Il legno (Fig. 12) è bianco avorio, di grana compatta e omogenea, moderatamente duro. Può essere impiegato nella realizzazione di piccoli mobili da industria, giocattoli e spazzole.

Fig. 12. Legno di *A. pseudoplatanus*

4.1.5 L'areale

L'*A. pseudoplatanus* risulta ampiamente diffuso in Europa specialmente nelle regioni montane: Germania (Harz), Russia (Crimea e Caucaso), Spain (Pyrenei), Francia (Catena di Cantabrian), Corsica, Alpi svizzere, Bosnia, Grecia del nord, sui Carpazi in Polonia, Slovacchia e Romania. L'estremo limite orientale è localizzato intorno al Mar Caspio. Nonostante non vi sia nativo si è ampiamente sviluppato e naturalizzato nell'isola britannica, in Belgio, Olanda nel nord della Francia, nel nord della Germania e in Scandinavia (Fig. 13).

In Italia è presente sulle Alpi, sull'Appennino settentrionale e centrale (compresi i rilievi minori), in Padania, sull'Appennino meridionale ed in Sicilia (Fig. 14 a).

Nel suo stato naturale l'*A. pseudoplatanus* non forma delle vere e proprie foreste ma si presenta in gruppi di alberi più o meno isolati; unico esempio di una foresta compatta è rinvenibile in Germania a Thüringen.

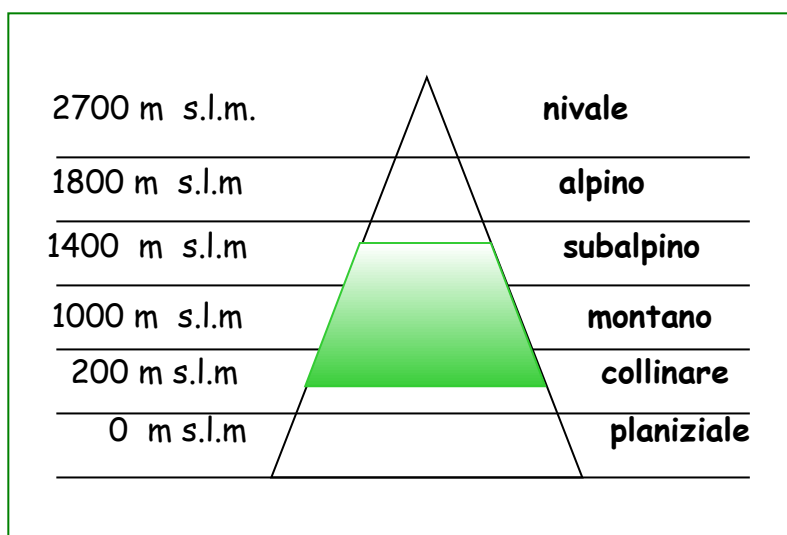
Di norma questa pianta è parte di boschi montani, soprattutto faggete (500-1500 m s.l.m.) (Fig. 14 b), delle foreste di Betulla e di Abete; raramente raggiunge altitudini di 2000 metri, fino al limite del bosco in forma arbustiva.



Fig. 13. *A. pseudoplatanus* in Europa.
(www.luirig.altervista.org).



a)



b)



c)

Fig. 14 a) *Acer pseudoplatanus* in Italia; b) distribuzione altitudinale di *A. pseudoplatanus* in Italia; c) periodo di antesi di *Acer pseudoplatanus*.
(www.luirig.altervista.org).

4.1.6 La storia

Acer pseudoplatanus è il più comune degli aceri in Europa ed è la specie individuata come “tipica” da Linneus nel 1753. Come nel caso di *Acer platanoides*, anche per questa specie molte forme geografiche e varietà sono state ricondotte direttamente a sinonimi della specie. Dal punto di vista evolutivo il più prossimo all’ *A. pseudoplatanus* risulta l’*A. heldreichii* spp. *heldreichii* e spp. *trautvetteri* sebbene queste subspecie presentino foglie profondamente diverse, con lobi molto più profondamente fessurati.

4.1.7 L’ecologia

Diffuso in tutta la penisola, allo stato sporadico o in piccoli gruppi, si ritrova nei boschi misti di latifoglie dal piano basale (suborizzonte submontano) a quello montano.

Richiede un clima piuttosto fresco e terreni fertili anche se di diversa natura mineralogica, con esclusione di quelli compatti.

Moderatamente lucivago, sopporta l’ombra in gioventù ed è l’Acero più diffuso in Italia, nelle seguenti associazioni (Pignatti, 1998):

- Bosco misto di acero montano, frassino e faggio (Asaro-Fagetum) Pignatti (1964)

Stazione: vallecole, pendii ombrosi con elevata umidità atmosferica, su detrito di falda o blocchi

- Bosco misto di acero montano, tiglio e olmo montano (Cirsio Erisithali-Ulmetum) Antonietti (1968)

- Castagneto subalpino (Arunco-Aceretum) Moor (1952)

Stazione: pendii umidi e freschi

- Abeti-faggeta a *Cardamine trifolia*. (Cardamini Trifoliae-fagetum) Mayer e Hofmann (1969) Oberd. E Müller (1984).

Stazione: pendii freschi e nebbiosi, forre e doline, generalmente su blocchi calcarei.

- Faggeta a *Dentaria* a 5 foglie (Cardamini Pentaphyllae-Fagetum Mayer e Hofmann (1969).

Stazione: ambiente montano, generalmente su stazioni in pendio, per lo più su calcare.

- Faggeta a *Streptopus* (Streptopo-Fagetum Ellenb e Klötzli, 1972).

Stazione: pendii freschi su substrati blandamente acidi.

- Faggeta a *Sesleria italica* (Seslerio italica-fagetum) Paglia (1995)

Stazione: pendii montani su flysch calcareo-marnoso della formazione dell’Alberese.

- Faggeta a *Luzula albida* (Luzulo Albidae-Fagetum) Meusel (1937)

Stazione: pendii franosi su substrati acidi (generalmente arenarie quarzitiche e filladi).

- Boscaglia ripariale di ontano bianco (Alnetum Incanae) Lüdi (1921)

Stazione: greti dei torrenti montani

– Faggeta a *Ostrya* (Ostro-Fagetum) Wraber (1966)

Stazione: pendii freschi nella fascia di transizione tra faggeta e querceto misto.

Richiede un clima piuttosto fresco e terreni fertili

4.1.8 Numero cromosomico

2n= 52 (poliploide) (Darlington 1955)

4.1.9 Subspecie

Nel caso dell' *A. pseudoplatanus* in realtà negli ultimi anni sono annoverate numerose varietà naturali e forme ma nessuna di essa è stata sostanzialmente riconosciuta come subspecie. In allevamento frequentemente si realizzano ibridi fra *Acer heldreichii* e *Acer pseudoplatanus* (*A. x pseudo-heldreichii*, Fukarek & Celio, 1959)

4.1.10 L'importanza

L' *A. pseudoplatanus* è la più diffusa specie di acero in Europa; è la specie tipo del genere *Acer* pubblicata da Linneo (1753). Come *A. platanoides* molte altre forme geografiche e varietà sono state introdotte ed assimilate a sinonimo della specie.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), de Joung (1976), Krussmann (1976 a), Linnaeus (1753), Murray (1970 c.), Pax (1902), Poiárkova (1933 b), Rehder (1986 facs.), Yaltirik (1967a).

4.2 *Acer monspessulanum* ssp. *monspessulanum* L. (1753)

Sezione *Acer*

Serie *Monspessulana*

4.2.1 Sinonimi

A. trifolium Duhamel (1755)

A. trilobatum Lamark (1786)

A. trilobum Moench (1794)

A. ibericum Bieberstein ex Willdenow (1806)

A. illyricum (hort. ex Tausch) Reichenbach (1829)

A. monspessulanum var. *ibericum* (Willdenow) Tausch (1829)

A. obtusatum var. *ibericum* (Willdenow) Loudon (1842)

A. creticum Miller, non L.

A. liburnicum hort. ex. Kirchner (1864)

A. litorale hort. ex Nicholson (1881)

A. talyschense Radde-Fomin (1931)

4.2.2 Tipo

LINN #1225.15 “*Habitat Monspeli*”.

4.2.3 I nomi comuni

Acero minore, Acero trilobo, Acero Cestuccio, Acero di Montpellier; da questa località deriva infatti l’epiteto specifico *monspessulanum*.



Fig. 15. *Acer monspessulanum* ssp. *monspessulanum*

4.2.4 La morfologia

Albero con habitus variabile, di piccole dimensioni ma densamente ramificato o talvolta un denso e ampio arbusto; è una pianta semisempreverde o decidua, in alcune zone più selvagge può sviluppare una boscaglia, presenta un'altezza variabile dai 4 m ai 12 m ed una chioma larga e fogliosa.

La corteccia è grigio-cenere, giallastra, liscia da giovane più scura e screpolata longitudinalmente negli individui più adulti (Fig. 16).



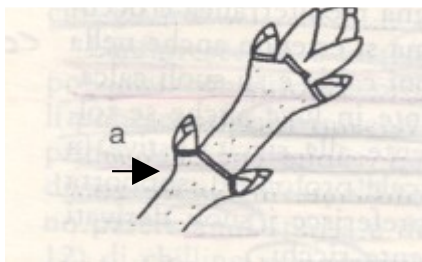
Fig. 16. Corteccia di *Acer monspessulanum*

Le gemme (Fig. 17) sono piccole, rosso brune, rivestite da perule a margine ciliato sono divergenti dal ramo.

Fig. 17. Gemme di *Acer monspessulanum*.

gemme divergenti dal ramo.

Gemme piccole, rosso brune, rivestite da perule a margine ciliato.



I giovani rami sono fini, lunghi e g

Le foglie sono caduche, coriacee e lucide. Sono disposte a coppie opposte lungo i rami. Nelle stazioni calde, opposte e semplici, con radi denti, di consistenza coriacea, pubescenti sulla pagina inferiore, lungamente picciolate (Fig. 19).

Fig. 18. Foglia triloba di *Acer monspessulanum*. Le foglie sono caduche e coriacee.

Fig. 19. Foglie trilobe (a), lungamente picciolate (b) e frutti di *Acer monspessulanum*. L'angolo compreso fra le samare è quasi nullo (c).

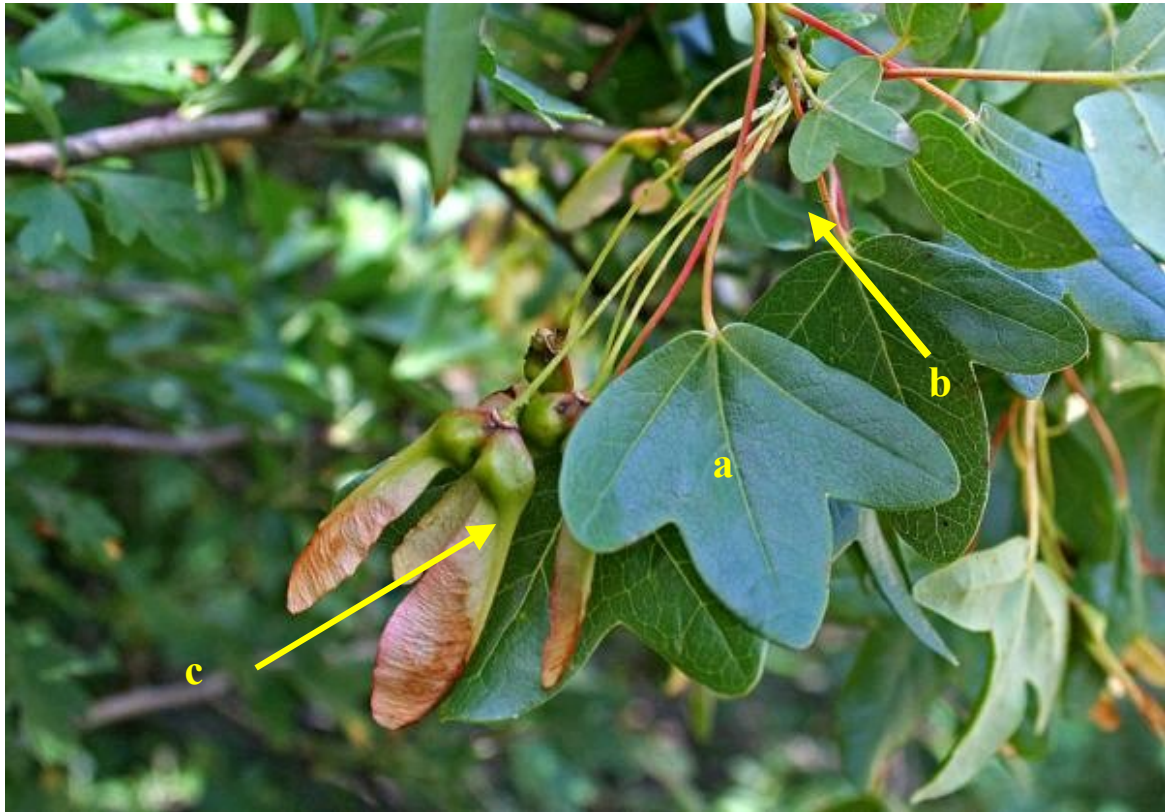


Fig. 19. Foglia triloba di *Acer monspessulanum* e samare. a) Foglie caduche e coriacee; b) lungo picciolo; c) samare a parete scura.

I fiori sono poligami (K 5, C 5, A 5, G (2)), verde-giallognoli, di piccole dimensioni, riuniti in corimbi lassi, ascellari, dapprima eretti poi pendenti in piena fioritura (Fig. 20). Si evolvono prima della fogliazione. Talvolta contemporaneamente.



Fig. 20. Infiorescenze di *Acer monspessulanum*

Il frutto è una disamara con ali poco divaricate, quasi parallele, lunghe circa 2-2,5 cm e con carpelli molto convessi, a parete scura (Fig. 19).

Il legno è il più duro e il più pesante tra quelli dei nostri aceri; è di colore rossastro con duramen più scuro di quello dell'acero campestre. Viene utilizzato per lavori di tornio e intaglio. E' ottimo come combustibile.

4.2.5 L' areale

A. monspessulanum ssp. *monspessulanum* è presente in tutta l'area mediterranea (Fig. 21), Spagna, Portogallo, Grecia, Italia, Turchia, Sud dell'Ucraina, lungo il Mar Nero e della Georgia; presente anche in Libano, dove gli individui presentano foglie di minor dimensioni. E' presente nel sud della Francia e occasionalmente anche in Germania spingendosi a nord fino al 50° parallelo, lungo i versanti fluviali più caldi. In Europa, alle latitudini più a nord, può solo crescere come arbusto sebbene con successo come in Gran Bretagna, nei Paesi del Benelux, nelle zone più miti della Danimarca, a sud della Svezia e nel Nord America. In Italia vegeta prevalentemente nei boschi termofili di latifoglie decidue e, soprattutto in quelli di sclerofille sempreverdi, come nella macchia. Da 0 a 1000 m s.l.m. (Fig. 22 c)

Sul territorio nazionale è diffuso dalle prealpi alla Sicilia; in Italia settentrionale è presente nei versanti meridionali della fascia pedemontana in Lombardia e Veneto; si ritrova in tutte le regioni fatta eccezione del Piemonte e della Pianura Padana. Si rinviene nella sottozona calda del *Castanetum* in tutta la penisola, nelle isole, in Liguria (Fig. 22 a) in fasce altitudinali comprese fra 0 e 1000 m s.l.m. (Fig. 22 b) .



Fig. 21. Distribuzione di *Acer monspessulanum* in Europa.
(www.luirig.altervista.org).

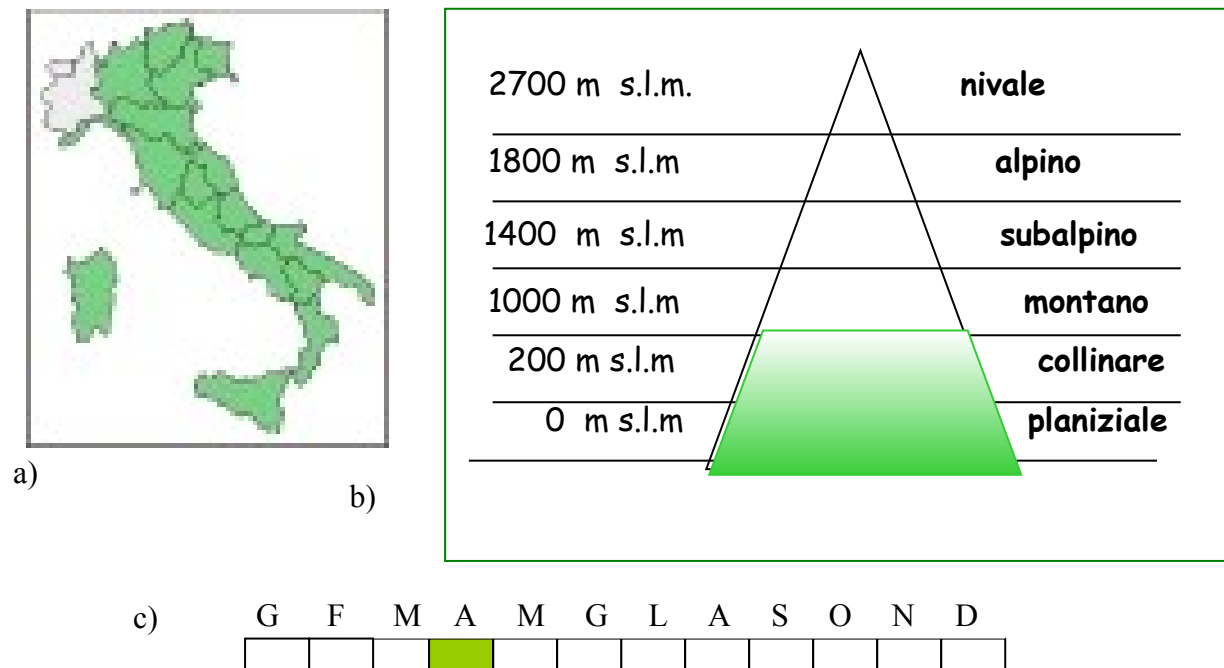


Fig. 22. a) *Acer monspessulanum* in Italia; b) Distribuzione altitudinale di *A. monspessulanum* in Italia; c) Periodo di antesi di *Acer monspessulanum*.
(www.luirig.altervista.org).

Nelle aree più calde è una specie presente nelle stazioni più fresche, tipicamente associato alla roverella nella foresta mediterranea decidua. Sporadicamente può trovarsi come essenza minore nella foresta mediterranea sempreverde. Con le altre subspecie è considerata una specie eurimediterranea, diffusa nel Nord Africa (Algeria e Marocco), dalla penisola iberica all'Anatolia fino al Caucaso e all'Iran e Palestina.

4.2.6 La storia

L'epiteto proviene da Montpellier antica città nel sud della Francia dove questa specie è abbondantemente rappresentata. Questa specie fu presentata da Linneo nel 1753 insieme alle altre specie ben note come *A. campestre*, *A. negundo*, *A. pensylvanicum*, *A. platanoides*, *A. pseudoplatanus* e *A. rubrum*. Per l'ampiezza del suo areale, questa specie è presente sotto forma di numerose varianti geografiche. La moderna tassonomia ha ridotto molte di queste cosiddette forme allo stato di cultivars a semplici sinonimi della stessa specie. Si trovano numerosi sinonimi in letteratura.

4.2.7 L'ecologia

E' una specie a crescita molto lenta, molto eliofila e termofila, predilige suoli calcarei ma cresce anche su quelli più acidi. Si comporta anche come una pianta xerofila crescendo bene anche su versanti rocciosi ed in ambienti piuttosto aridi. Pur avendo un'ecologia differente è possibile ritrovare *A. monspessulanum* insieme a *A. opalus* con il quale tende talvolta ad ibridarsi. Questi ibridi naturali, dalle denominazioni più diverse, sono alberi di piccole dimensioni (al massimo 10 m di altezza), che si differenziano dalle specie parentali sia per la forma delle foglie sia per le dimensioni di queste che risultano intermedie fra quelle dei due genitori. Questi ibridi spontanei sono stati segnalati nel nord della Spagna, in Francia meridionale, in Italia, Slovenia, Croazia, Bosnia, Serbia, Montenegro e Macedonia.

In particolare in Italia è riscontrabile nelle seguenti associazioni boschive:

- Boscaglia a *Cercis* e *Acer* (Cercidi-Aceretum) Lucchese e Pignatti ass. nov.

Stazione: pendii calcarei soleggiati in prossimità della costa.

- Cerreta submediterranea dell'Italia centrale (Rubio-Quercetum Cerridis), (Pignatti E. e S., 1968; Bas Petrolis *et al.*, 1988).

Stazione: colli argillosi dell'Italia centrale.

4.2.8 Il numero cromosomico

$2n=26$

4.2.9 Le subspecie

A. monspessulanum ssp. *assyriacum* (Pojarcova) Rechinger f. (1969): *assyriacus*, epiteto derivante dall'antico impero Assyria, lungo le pianure attraversate dal Tigri (Mesopotamia) attualmente territorio iracheno e parte più orientale della Turchia. Foglie trilobate, solo occasionalmente pentalobate, su germogli sterili. Non sono stati visti né fiori né frutti. Si presenta come un denso arbusto. Questa subspecie non è presente in Europa e in America né naturalmente né coltivata. E' riportata solo in letteratura o presente negli erbari.

Riferimenti: Murray (1970c), Rechinger (1969).

A. monspessulanum ssp. *cinerascens*: l'epiteto deriva da *cinerascens* cioè grigiastro. Generalmente si presenta come arbusto, piuttosto densamente ramificato, non dissimile da *A. sempervirens*; i giovani germogli sono tomentosi, successivamente glabri. Foglie trilobe, verdi-grigiastre. I fiori non sono distintivi rispetto alle altre subspecie. Le samare sono quasi parallele fra loro, piatte e piccole. Si riscontra nel sudest della Turchia, Iraq, Libano e nella zona ovest dell'Iran su terreni secchi e rocciosi. Pur essendo presente in erbari e frequentemente citata in letteratura, questa subspecie non è mai stata rinvenuta in popolamenti né in Europa né in Nord America.

Riferimenti: Krussmann (1976 a), Murray (1970 c), Schwerin (1898).

A. monspessulanum ssp. *ibericum* (Bieberstein) Yaltirik (1967): *ibericus* deriva da Iberia un'antica provincia dell'Impero Romano, nel Caucaso, in Georgia. E' un piccolo albero la cui altezza giunge a circa 8 m. Corteccia grigiasta, presenta dei germogli glabri, di un marrone chiaro se giovani e successivamente di color grigio-bruno. Foglie trilobate, coriacee, verdebluastre, glabre e lucenti sulla pagina superiore, più tormentose nella pagina inferiore. I fiori sono corimbi sessili, penduli, semplici, solo raramente composti, Le samare sono verticali, leggermente divergenti e comunque a formare un angolo acuto, i frutti sono legnosi, glabri sulla pagina esterna e tormentosi su quella interna. Il suo areale di distribuzione è limitato al Caucaso, al nordest della Turchia, al nord e nordovest dell'Iran.

Riferimenti: Pojarkova (1949), Yaltirik (1967), Rechinger (1969), Murray (1970c).

A. monspessulanum ssp. *microphyllum* (Boissier) Bornmuller (1914): l'epiteto trae origine dalle foglie di piccole dimensioni. Si presenta come un arbusto densamente ramificato. I fiori e i frutti non sono stati mai visti. Cresce sulle montagne del Libano, in Palestina, in Siria e nel sud della Turchia da dove questa subspecie è originaria. Questa specie così poco conosciuta non è coltivata. Potrebbe essere assimilata ad *A. hyrcanum* ssp. *regina-amaliae* ma al momento sono talmente poche le informazioni in proposito che risulta arbitrario trarre qualsiasi conclusione. Sarebbe inoltre interessante se questa specie è ancora presente in Libano. L'ultimo censimento è stato infatti realizzato 100 anni fa e negli ultimi 25 anni la guerra e la trasformazione agricola del suolo potrebbero aver modificato il quadro originario.

Riferimenti: Murray (1970 c).

A. monspessulanum ssp. *oksalianum* Yaltirik (1967): l'epiteto *oksalianum* in memoria del Dr. Oksal professore e direttore dell'Istituto di Botanica Forestale di Istanbul, Turchia. Arbusto di moderate dimensioni, con foglie pentalobate, marcatamente tomentose sulla pagina inferiore. Fiori mai rinvenuti. Si riscontra solo nel sud della Turchia. Anche questa specie non è stata riscontrata in forma coltivata.

Riferimenti: Murray (1970 c), Yaltirik (1967b).

A. monspessulanum ssp. *persicum* (Pojarkova) Rechinger f. (1969): *Persicum* da Persia (Iran). E' un arbusto, foglie trilobate larghe fino a 3 cm; fiori e frutti non sono stati rinvenuti. Presente solo in Iran con particolare riferimento alla zona centrale. Alla stessa stregua di tutte le altre sottospecie precedentemente descritte, anche il *persicum* non è coltivato.

Riferimenti: Murray (1970 c).

A. monspessulanum ssp. *turcomanicum* (Pojarcova) Murray (1969): l'epiteto *turcomanicum* deriva da Turkmeniya, presente in prossimità delle catene caucasiche.

Riferimenti: Murray (1970 c), Krussmann (1976 a),

4.2.10 L'importanza

In vivai ed arboreti vengono ottenuti ibridi antropogenetici fra *A. monspessulanum* e *A. opalus*.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), Firsov (1982), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Linnnaeus (1753), Murray (1970 c. 1974b), Pax (1902), Poiárkova (1933 b), Rehder (1986 facs.), Schneider (1912), Schwerin (1894, 1898, 1900).

4.3 *Acer opalus* ssp. *obtusatum* L. (Willdenow) Gams (1925)

Sezione *Acer*

Serie *Monspessulana*

4.3.1 I sinonimi

A. opulifolium var. *tomentosum* Tausch (1829)

A. opulifolium var. *velutinum* Boissier (1867) non *A. velutinum* Boissier (1846)

A. italum var. *neapolitanum* (Tenore) Dieck (1885)

A. italicum var. *aetnense* Tineo ex. Strobl (1885)

A. opalus var. *bosniacum* Maly (1906), in syn.

4.3.2 Tipo

“*in siccis montosis Hungariae et Croatiae*”

4.3.3 I nomi comuni

Acero Bosniaco

4.3.4 La morfologia

È una pianta di piccole dimensioni o un arbusto a più fusti di altezza intorno agli 8 metri.

La corteccia, grigio violetta, è liscia ed uniforme da giovane e distaccantesi in placche nei vecchi tronchi (Fig. 23) come quella dell'*A. opalus* spp. *opalus*. I rami di 3-5 anni presentano delle lacerazioni trasversali.

Le foglie (Fig. 24) sono mediamente più piccole dell'*A. opalus* ssp. *opalus* con lobi più corti ed ottusi tomentosi nella pagina inferiore allo stato giovanile. I margini sono debolmente dentati, le basi fogliari più o meno cordate. Il picciolo è generalmente più breve della lamina.

Fig. 23. Corteccia di *Acer obtusatum*. Risultano evidenti le desquamazioni in placche.





Fig. 25. Infiorescenza di *Acer opalus* ssp. *obtusatum* (foto www.flickr.com)

Fig. 24. Foglie



I fiori sono
compaiono pri

Le samare,
piccole e verdi

).

e che
29 c).

sono

Fig. 26. Foglie e infruttescenze di *Acer opalus* ssp. *obtusatum*.

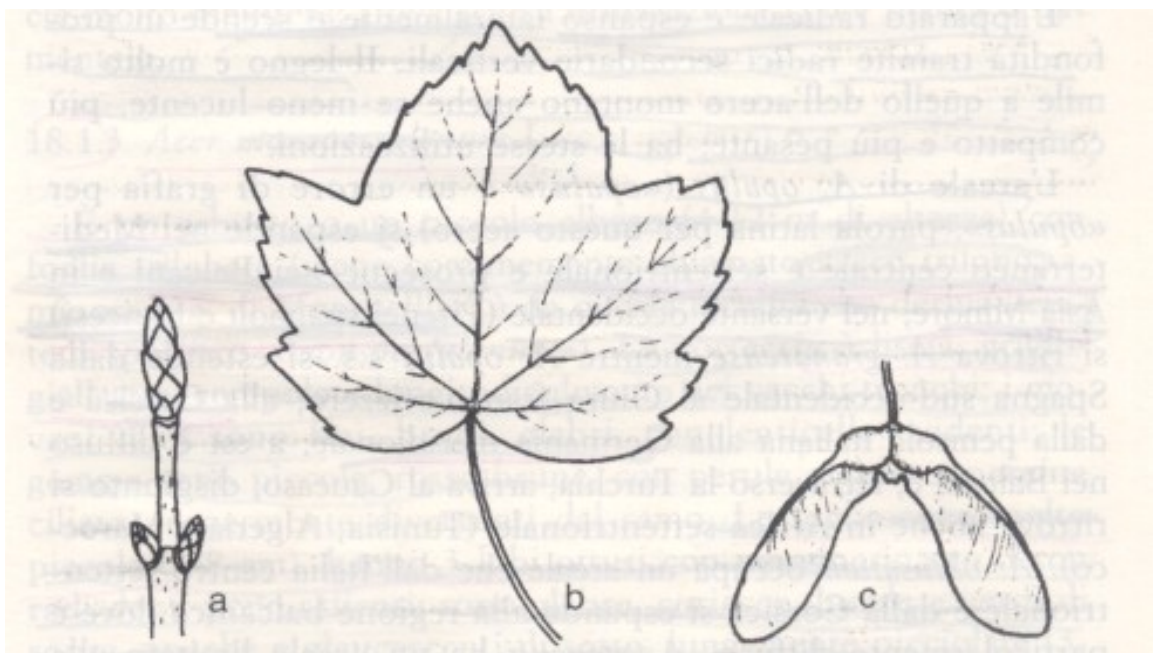


Fig. 27. Gemma (a), foglia (b) e disamara (c) in *Acer obtusatum* (specie collettiva *A. opalus*) (Gellini e Grassoni, Botanica Forestale II).

4.3.5 L' areale

E' diffuso in Croazia, Serbia, Slovenia. Non cresce all'interno degli attuali confini d'Ungheria (Fig. 28).

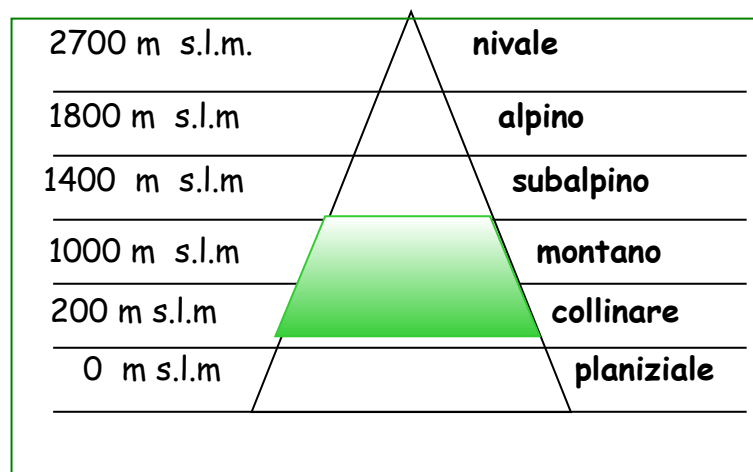
In Italia si ritrova in boschi di latifoglie con rovere, cerro e castagno, tra i 400 e i 1300 m s.l.m. soprattutto al sud (Sicilia e Calabria) (Fig. 29 a e 29 b). Solo occasionalmente in Nord Africa.



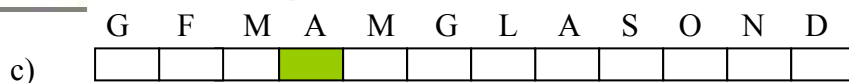
Fig. 28. Distribuzione di *A. obtusatum* in Europa. (www.luirig.altervista.org).



a)



b)



c)

Fig. 29. Distribuzione di *A. obtusatum* in Italia (a); Distribuzione altitudinale di *A. opalus* ssp. *obtusatum* in Italia; c) Periodo di antesi di *A. opalus* ssp. *obtusatum*.

(www.luirig.altervista.org).

4.3.6 La storia

L'epiteto *obtusatus* indica corti e ottusi lobi.

4.3.7 L'ecologia

In Italia si riscontra nelle seguenti associazioni boschive :

- Cerreta con *Ostrya* ed acero (Aceri Obtusati-Quercetum Cerridis) Ubaldi e Speranza (1982)

Stazione: pendii freschi e umidi nelle vallate appenniniche della Romagna e dell'Umbria.

- Faggeta a *Centaurea montana* (Centaureo Montanae-Fagetum) Ubaldi (1974)

Stazione: pianori oppure pendii poco inclinati su massi calcarei.

- Ostrieto con *Sesleria italica* (Seslerio Italicae-Ostryetum) Ubaldi (1974)

Stazione: ambienti di forra, dai quali irradia sulle pendici calcaree e marnoso-arenacee.

- Acereto a *Sesleria* (Seslerio-Aceretum) Pignatti (1998)

Stazione: pendii ombrosi umidi e forre.

- Ostrieto a *Scutellaria* (Scutellario-Ostryetum) Pedrotti (1979)

Stazione: vallate umide, versanti freschi con esposizione settentrionale.

4.3.8 Il numero cromosomico

$2n=26$ (Santamour 1988)

4.3.9 Altre subspecie

A. opalus Miller (1768) ssp. *opalus* (specie tipica)

A. opalus ssp. *hispanicum* (Pourret) Murray (1969)

4.3.10 L'importanza

Questa specie viene validamente utilizzata negli interventi di rinaturalizzazione e di ingegneria naturalistica.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Murray (1970 c. 1977), Pax (1902), Rehder (1986 facs.), Schneider (1912).

4.4 *Acer opalus* spp. *opalus* L.

Sezione *Acer*

Serie *Monspessulana*

4.4.1 I sinonimi

- A. italicum* Lauth (1781).
- A. montanum* Dalechamps ex Lamarck (1786).
- A. opulifolium* Villars (1786).
- A. vernum* Carrière ex Lamarck (1786).
- A. apulifolium* Persoon (1805).
- A. opulifolium* var. *opalus* (Miller) Koch (1853).
- A. italicum* Lauche (1880).

A. rupicolum Chabert (1910).

4.4.2 Tipo

Acer # 8, P. Miller; BM.

4.4.3 I nomi comuni

Acero italiano, Loppo, Acero alpino

Acer opalus spp. *opulus*.

4.4.4 La morfologia

Specie molto simile ad *Acer obtusatum* ma rispetto a questa, *A. opalus* ssp. *opulus* presenta foglie adulte glabre, salvo raramente sulla nervatura. La loro morfologia è piuttosto variabile; da trilobate a pentalobate. Peduncoli fiorali glabri e penduli, samare quasi parallele. Può raggiungere 10-13 m di altezza ma spesso rimane un arbusto in habitat naturale. I rami più giovani sono glabri, anche se presenta un'elevata variabilità.

La corteccia è relativamente liscia e grigia, fessurata e nera negli individui più adulti (Figg 30 a), b) e c)).

Le foglie possono essere trilobate o pentalobate, ottuse e ampie dai 6 cm ai 15 cm, glauche sulla pagina inferiore ad eccezione delle nervature (Fig. 31). Il picciolo, più corto della lamina è di solito rossiccio e glabro.

Le infiorescenze sono terminali, giallo-verdi (Fig. 32) corimbi eretti e riuniti in piccoli ombrelli, molto fioriferi; esse compaiono poco prima o contemporaneamente alle foglie. Anche i peduncoli fiorali sono glabri (K 5, C 5, A 5, G (2)) e lunghi (Fig. 33). Antesi in aprile (Fig



a)



b)



c)

Fig. 30. Corteccia di *Acer opalus* ssp. *opulus* individui più giovani (a) e (b) ed in individuo adulto (c) (foto Botanical Images Database).



a)

Fig. 32

Fig. 31. Foglie di *A. opalus* ssp. *opalus*. Pagina inferiore (a); pagina superiore (b). Particolare di picciolo rossiccio, più corto della lamina e glabro.

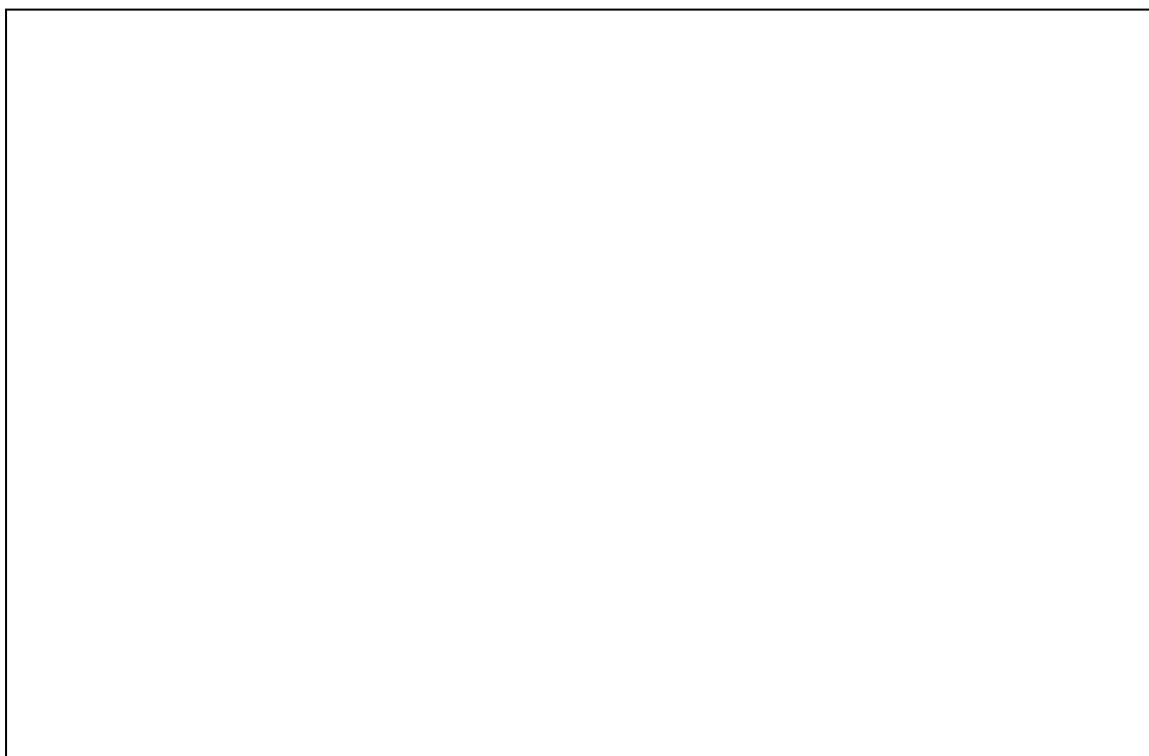
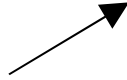


Fig. 33

Figg. 32 e 33. Infiorescenza di *A. opalus* ssp. *opalus*. I peduncoli fiorali sono lunghi (Foto: H. Schneider).



Le samare sono erette, di lunghezza media di 3-5 cm; ali brune lievemente divergenti, debolmente appressate alla base, quasi parallele (Figg. 34 e 35c).

Le gemme presentano perule embricate (Figg. 35a e 36).

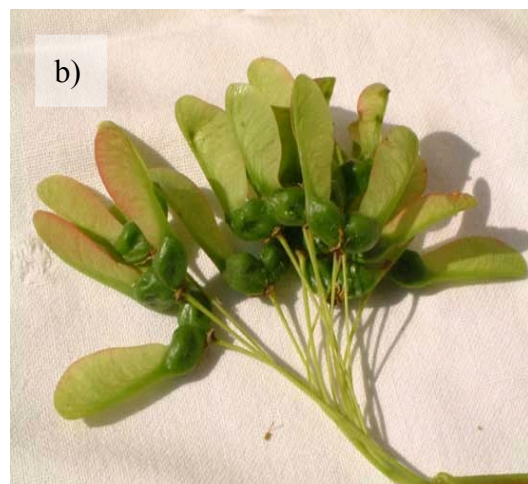
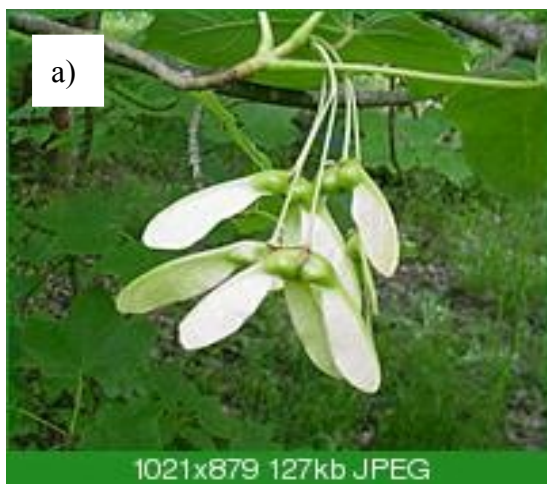


Fig. 34 (a) e (b). Samare di *Acer opalus* ssp. *opalus* (foto www.ubcbotanicalgarden.org)

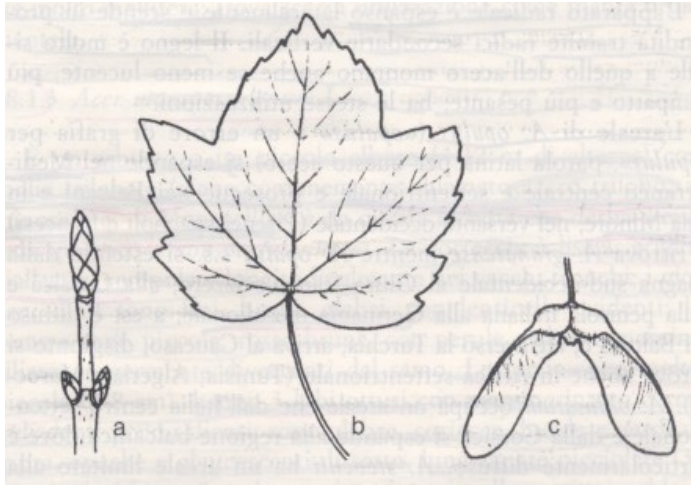


Fig. 35

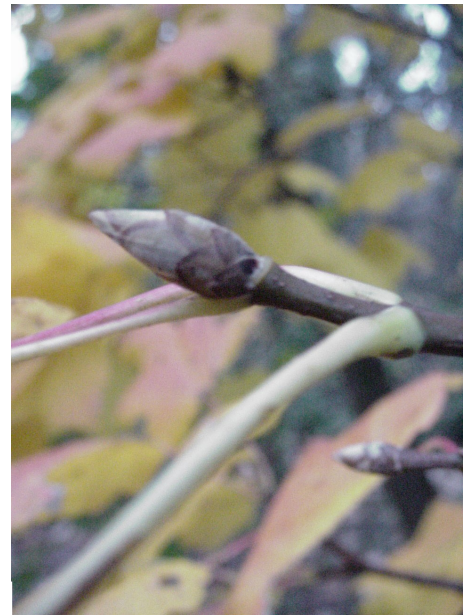


Fig. 36

Fig. 35 (a) Gemma, (b) foglia e (c) frutto di *Acer opalus* ssp. *opalus*; l'angolo compreso fra le samare è inferiore a 90° . (da Gellini e Grossoni, Botanica Forestale).

Fig. 36. Gemme di *Acer opalus* ssp. *opalus*

4.4.5 L' areale

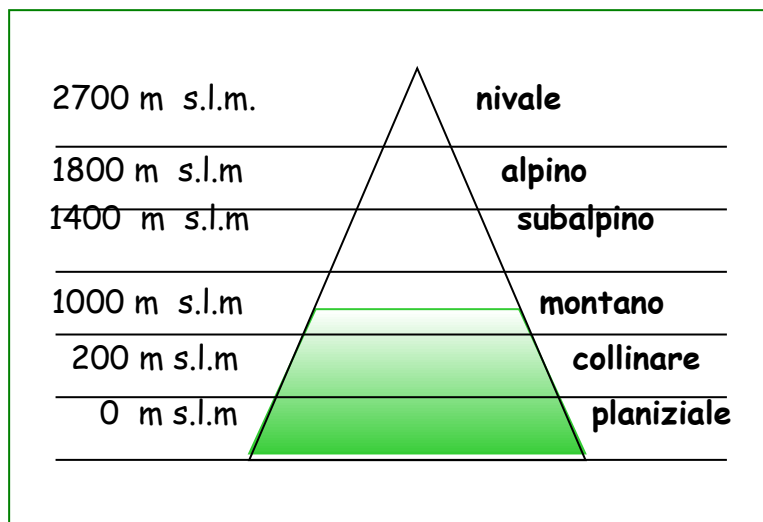
Si sviluppa in boschi di latifoglie, da 0 a 1000 m s.l.m. (Fig. 38 b). In Europa dalle Montagne dello Jura in associazione con *Buxus sempervirens*, *Ilex aquifolium*, *Prunus mahaleb*, *Quercus pubescens*, *Sorbus aria* e *Sorbus terminalis*, in Svizzera e Francia, sui Pirenei, Spagna, Corsica, verso est nel Caucaso, in Marocco e Algeria (Fig. 37). In Italia è presente in Piemonte, (Val di Susa, Langhe, Val Tanaro e Scrivia, Alpi marittime, Appennino Ligure e Tosco-Emiliano; la sua presenza, seppur rara, è stata segnalata anche in Corsica e in Sicilia (Fig. 38 a) .



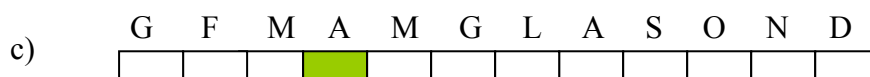
Fig. 37. Distribuzione di *Acer opalus* in Europa



a)



b)



c)

Fig. 38. a) *Acer opalus* ssp. *opalus* in Italia; b) Distribuzione altitudinale di *A. opalus* ssp. *opalus* in Italia; c) Periodo di antesi di *Acer opalus*. (www.luirig.altervista.org).

4.4.6 La storia

L'epiteto deriva da “*opulus*” un vecchio generico nome di Acero; nome derivante anche dalla similarità con *Viburnum opulus*.

4.4.7 L'ecologia

In Italia si riscontra nelle seguenti associazioni boschive :

- Querceto a rovere dell'Appennino settentrionale (Physospermo-Quercetum Petreae)

Oberd. e Ofmann (1967)

Stazione: in pendio nelle vallate esposte alle correnti umide provenienti dal Mar Ligure.

- Ostrieto a *Knautia* dell'Appennino pavese e tortonese (Knautio-Ostryetum) Mondino *et al.* (1993).

Stazione: pendii umidi e ombrosi, forre.

- Ostrieto ligure-piemontese a leucantemo (Leucanthemo-Ostryetum) Barbero e Bono (1970)

Stazione: ambienti di forra.

- Ostrieto emiliano ad acero alpino (*Ostryo-Aceretum Opulifolii*) Ubaldi *et al.* (1987)

Stazione: pendii umidi e freschi su marne e arenarie.

- Querceto a roverella e bosso (*Buxo-Quercetum Pubescentis*) Br.-Bl.(1931) oberd. (1979)

Stazione: cedui su pendii, sia su calcare che su silice.

4.4.8 Il numero cromosomico

$2n=26$

4.4.9 Altre subspecie

A. opalus ssp. *opalus* è la subspecie tipica.

A. opalus ssp. *hispanicum* (Pourret) Murray (1969), popolamenti presenti in Spagna e Portogallo, caratterizzati da foglie di piccole dimensioni.

A. opalus ssp. *obtusatum* (Willdenow) Gams, riconosciuto sui rilievi montani della Bosnia Erzegovina. I lobi fogliari sono più corti di quelli della subspecie *opalus* e la tessitura fogliare più robusta; non differiscono per altre caratteristiche.

4.4.10 L'importanza

C'è molta confusione relativamente alla nomenclatura di questa specie e di conseguenza esistono numerosi sinonimi. Il convalidato nome di "*opalus*", attribuito da Miller nel 1768, fu inizialmente utilizzato impropriamente da Ray nel 1688 al posto della versione corretta "*opulus*". In realtà il termine *opalus* fa riferimento ad *Acer italum*, la controparte meridionale dell'*Acer campestre*.

Nonostante sia una delle poche specie native dell'Europa, l'*A. opalus* risulta abbastanza raro nella coltivazione e nella trasformazione. Appare spesso assimilato ad *A. monspessulanum* ma è immediatamente distinguibile da questo per le sue più ampie foglie e per l'habitus più sviluppato.

Ad un'osservazione sommaria potrebbe essere confuso con un piccolo *A. pseudoplatanus*, ma un esame più accurato evidenzierebbe molte differenze.

Il suo legno, di colore bianco-rosato con lucentezza sericea, compatto e duro é molto pregiato. Viene utilizzato per la fabbricazione di mobili fini, rivestimenti, e strumenti musicali. Viene anche usato per il rimboschimento di suoli calcarei collinosi e per alberature stradali.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), Hegi (1925), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Murray (1970 c), Pax (1902), Rehder (1986 facs.), Schneider (1912), Schwerin (1894), Walters (1968).

4.5 *Acer campestre* L. (1753)

Sezione *Platanoidea* Pax (1885)

4.5.1 Sinonimi

A. vulgare Borkhausen (1793).

A. campestre var. *hebecarpum* DC. (1824)

A. heterolobum Opiz (1825)

A. tomentosum var. *serotinum* Kitaibel (1864)

A. campestre ssp. *leiocarpon* (Wallroth) Pax (1890).

A. campestre ssp. *marsicum* (Gussone) Hayek (1921)

4.5.2 Tipo

LINN. No. 1225.14; LINN.

4.5.3 I nomi comuni

Acero comune, Acero di campo, Testucchio, Loppio, Acero oppio, Chioppo.

4.5.4 La morfologia

Si presenta come un piccolo albero o un arbusto di grandi dimensioni e molto ramificato, deciduo; presenta mediamente un'altezza compresa fra i 7 m e i 12 m ma mai superiore ai 20 m. Il tronco è spesso contorto e la chioma tondeggiante, a corona, molto ampia in proporzione all'altezza degli individui. Ha una crescita lenta e non è una specie longeva (di rado supera i 120 anni).

Il tronco presenta una corteccia di color bruno e fessurata in placche rettangolari (Figg. 39 e 40), i rametti sottili, bruci e pubescenti, talvolta percorsi da creste tuberose (Fig. 42).

Le gemme rossastre sono piccole e ricoperte da perule tormentose (Fig. 41 e 46 a).



Fig. 39. Corteccia in *A. campestre*
(Foto www.ecomuseovajont.it).



Fig. 40. Corteccia e sezione trasversale di
Acer campestre.

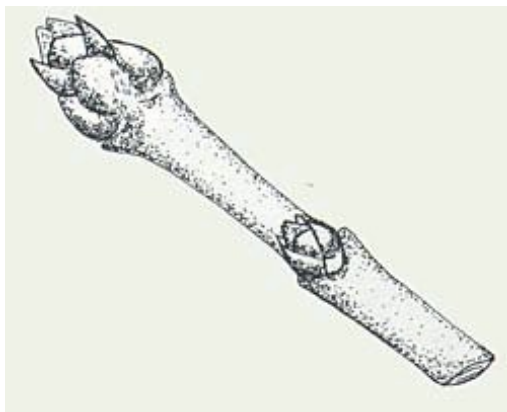


Fig. 41. Gemme di *Acer campestre*. (foto www.culturadelverde.imagelinetwork.com).



Fig. 42. Rametto di *A. campestre* con le caratteristiche escrescenze tuberose. (Foto www.actafungorum.org).

Le
massi
e la c
mentr
liscio



palmate,
nghe, con
mente tril
te chiara,



ono al
ntrale
scuro
iare è

to. Il picciolo, della stessa lunghezza della lamina fogliare, secerne lattice. Sulla base delle caratteristiche morfologiche l'*A. campestre* risulta inconfondibile. Fig. 43. Foglie di *Acer campestre* (Foto www.naturamediterraneo.com) e essere confuso sulla base della forma rognare seppur non per le dimensioni.



I fiori sono riuniti in radi corimbi terminali (Fig. 44) , spesso poligami di color giallo-verde. Il loro sviluppo è contemporaneo alle foglie, nei mesi di aprile e maggio (Fig. 49 c). Gli stami, numero di 8 sono inseriti al centro del disco nettario; sia i sepali che i petali, leggermente più lunghi dei precedenti sono ugualmente colorati di giallo-verde.



63

Fig. 45

La corteccia, giallo-rosea, risulta spesso tuberosa e fessurata.

Il legno risulta indifferenziato, rosa chiaro o bruno rossastro; è uno dei migliori della sua categoria, di tessitura chiusa e grana fine è pesante, tende a deformarsi, ottimo combustibile, gli anelli hanno un andamento irregolare e risultano ondulati anche longitudinalmente. La pianta è mellifera e le foglie trovano un ottimo impiego come foraggio.

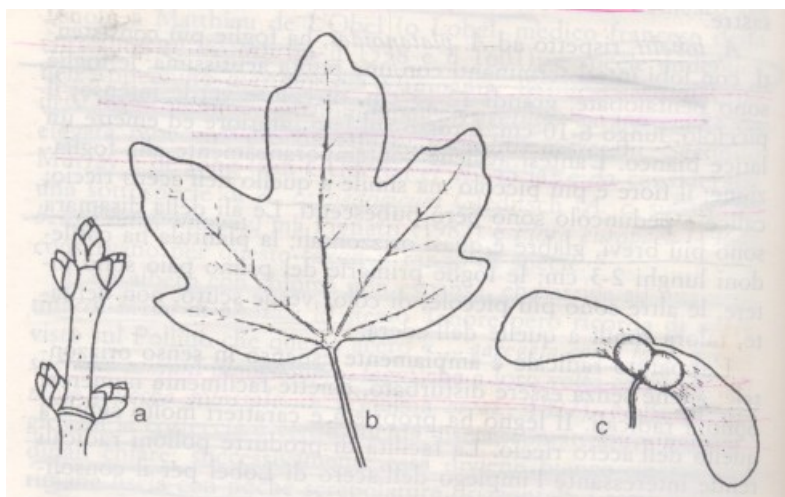


Fig. 47. (a) Gemma, (b) foglia e (c) frutto di *Acer campestre*; l'angolo compreso fra le samare è di 180° . (Gellini e Grassoni, Botanica Forestale).

4.5.5 L' areale

L'*A. campestre* è una delle poche specie europee, estremamente diffuso ed indigeno in quasi tutti i paesi europei, fatta eccezione della Scandinavia e della Finlandia. Manca in Scozia e

Irlanda. E' inoltre piuttosto raro nel sud della Spagna e Portogallo, ma compare in Nord Africa ed in Asia occidentale.

In Europa si espande in tutta la regione centro-meridionale aggiungendo ad est la Vistola e il Don (Fig. 48).

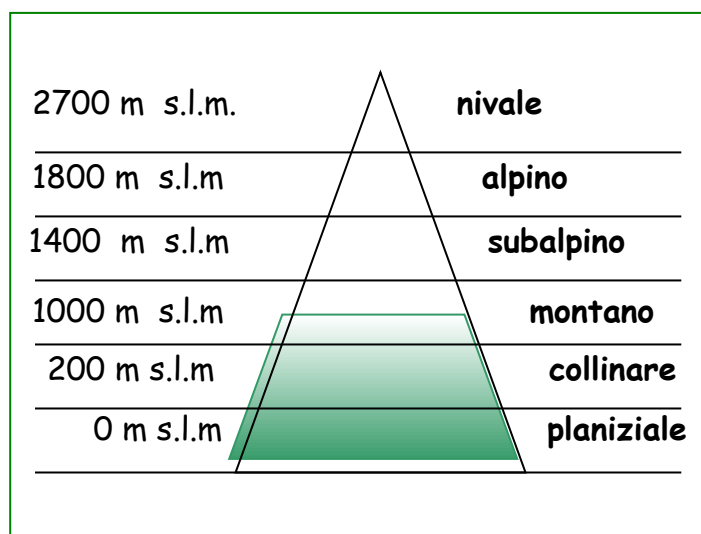
Fig. 48. Distribuzione di *Acer campestre* in Europa.



In Italia è comunissimo nei boschi mesofili, su suolo ricco, soprattutto nei querceti caducifogli, dal mare fino ai lembi inferiori del *Fagetum*. Si riscontra in aree pedocollinari, in pianura e lungo gli argini. In Sicilia fino a 1600 m s.l.m. Manca tuttavia in alta montagna e nelle zone più aride della fascia mediterranea (Figg. 49 (a) e 49 (b)).



a)



b)



Fig. 49. a) *Acer campestre* in Italia; b) Distribuzione altitudinale di *A. campestre* in Italia;
c) Periodo di antesi di *Acer campestre*.
(www.luirig.altervista.org).

4.5.6 La storia

Descritto da Linneo per la prima volta nel 1753, presenta numerose forme geografiche grazie alla sua ampia diffusione inizialmente considerate come specie differenti o come sottospecie, varietà o forme. Al momento attuale molte di queste differenti forme sono state ridotte a sinonimi o riconosciute come cultivars. L'uomo ha notevolmente diffuso l'acero campestre per il suo impiego come tutore per la vite e per la realizzazione di utensili ed attrezzi agricoli; costituisce inoltre uno degli elementi fondamentali delle siepi e dei margini dei boschi.

4.5.7 L'ecologia

Pianta perenne e caducifolia, ad accrescimento lento come ampi arbusti o alberi a chioma ampia e piatta alti fino a 10-12 m. E' una specie eliofila, moderatamente xerofila e termofila ma non spiccatamente lucivaga; si dimostra indifferente alla composizione chimico fisica del suolo anche se amplifica le sue produzioni su suoli ricchi e risulta competitiva nei confronti di altre specie quando si trova su suoli debolmente carbonatici o argillosi. Comunissimo in tutta la penisola allo stato sporadico, nei boschi misti di latifoglie del piano basale, su terreni diversi, magri e superficiali, ma specialmente su quelli calcarei o calcareo argillosi. Si presenta in Italia nelle seguenti associazioni forestali.

- Carpineto delle doline carsiche (Asaro-Carpinetum Betuli) Lausi (1964)

Stazione: nelle doline del Carso triestino

- Faggeta a *Centaurea montana* (Centaureo Montanae-Fagetum) Ubaldi (1974)

Stazione: pianori oppure pendii poco inclinati su massi calcarei.

- Faggeta a *Carex alba* (Carici Albae-Fagetum) Rubel (1930)

Stazione: pendii soleggiati, generalmente su calcare.

- Bosco misto di alloro e carpino (Lauro-Carpinetum Betuli) Lucchese e Pignatti (1991)

Stazione: forre nelle quali scorrono corsi d'acqua persistenti in ambiente submediterraneo francamente mediterraneo.

- Carpineto di forra (Carpino-Coryletum) Balzelli *et al.* (1980)

Stazione: forra umida e ombrosa.

- Bosco misto di acero montano, frassino e faggio (Asaro-Fagetum) Pignatti (1964)

Stazione: vallecicole, pendii ombrosi con elevata umidità atmosferica, su detrito di falda o blocchi.

-Bosco misto di acero montano, tiglio e olmo montano (Cirsio Erisithali-Ulmetum) Antonietti (1968)

Stazione: pendii umidi e forre

-Querceto a roverella e bosso (Buxo-Quercetum Pubescentis) Br.-Bl., (1931) Oberd. (1979)

Stazione: cedui su pendii, sia su calcare che su silice.

-Boscaglia a *Cercis* e Acero (Cercidi-Aceretum) Lucchese e Pignatti ass. nov.

Stazione: pendii calcarei soleggiati in prossimità della costa.

-Ostrieto prealpino (Buglossoidi-Ostryetum) Gerdol *et al.* (1982)

Stazione: pendii umidi e forre.

-Ostrieto insubrico a *Coronilla* (Coronillo-Ostryetum) Eskuche (1953)

Stazione: pendii umidi e freschi, forre.

-Ostrieto a *Knautia* dell'Appennino pavese e tortonese (Knautio-Ostryetum) Mondino *et al.* (1993)

Stazione: pendii umidi e ombrosi, forre.

-Ostrieto ligure-piemontese a leucantemo (Leucanthemo-Ostryetum) Barbero e Bono (1970)

Stazione: ambienti di forra

-Ostrieto emiliano ad acero alpino (Ostro-Aceretum Opulifolii) Ubaldi *et al.* (1987)

Stazione:pendii umidi e freschi su marne e arenarie.

-Ostrieto con *Sesleria italica* (Seslerio Italicae-Ostryetum) Ubaldi (1874)

Stazione: ambienti di forra dai quali irradia sulle pendici calcaree e marnoso-arenacee.

-Cerreta con *Ostrya* ed acero (Aceri Obtusati-Quercetum Cerridis) Ubaldi e Speranza (1982)

Stazione: pendii freschi e umidi delle vallate appenniniche dalla Romagna all'Umbria.

-Acereto a *Sesleria* (Seslerio-Aceretum) Pignatti (1998)

Stazione: pendii ombrosi e umidi, forre

-Cerreta submediterranea dell'Italia centrale (Rubio-Quercetum Cerridis) Pignatti E. e S. (1968), Bas Petroli *et al.* (1988)

Stazione: colli argillosi dell'Italia centrale

-Bosco misto di cerro e farnetto (Lathyro Digitati-Quercetum Cerridis) Bonin e Gamisans (1976).

Stazione: ambienti pianeggianti o dolcemente inclinati sulle colline argillose e bassa montagna.

-Bosco misto a cerro e farnetto dell'Italia centrale (Echinopo-Quercetum Frainetto) Blasi e Paura (1993)

Stazione: colli arenaci, paesaggio vulcanico della Tuscia, pianura.

-Cerreta dell'Appennino meridionale (Physospermo Verticillati-Quercetum Cerridis) Aita *et al.* (1977).

Stazione: colline argillose o marnoso-arenacee della Basilicata

-Bosco di pioppo bianco (Populetum Albae) Tchou (1949)

Stazione: alvei di corsi d'acqua a carattere torrentizio

-Bosco submediterraneo a frassino e ontano (Alno-Fraxinetum Oxicarpace) Br.-Bl.(1915) Tchou (1946)

Stazione: greti dei torrenti, lungo le sponde dei fiumi, sorgenti.

-Sughereta di Sicilia (Genisto Aristatae-Quercetum Suberis) Brullo (1983)

Stazione: pendii arenaci percorsi frequentemente dal fuoco

4.5.8 Numero cromosomico

$2n=26$ (Darlington, 1955)

4.5.9 Le Subspecie

A causa della vasta distribuzione naturale e dell'enorme variabilità di questa specie, risulta estremamente difficoltoso riconoscere distinte subspecie. In proposito la letteratura fa riferimento alle seguenti distinzioni.

A. campestre ssp. *leiocarpon* (Wallroth) Pax (1890): foglie mediamente più ampie, leggermente pubescenti con margine intero. I rami più giovani in genere non sono rivestiti, se non debolmente di sughero. In Austria si presenta come albero mentre nelle regioni più a nord come la Germania dell'est, manifesta un *habitus* più arbustivo. Sono sinonimi la var. *austriacum* DC. (1824). Una classificazione centro europea, in realtà divide questa subspecie in varietà e *formae* (Koch 1869, 534) comprendendo la "subvarietà" *molle* (Opiz) Koch una pianta con foglie molto pubescenti e la "subvarietà" *silvestre* (Wenderoth) Koch con foglie molto più coriacee.

A. campestre ssp. *marsicum* (Gussone) Hayek (1921): foglie 3-5 lobate, lobi subinteri, non lobate, frutti da tomentosi o completamente glabri di dimensioni variabili, talvolta rossi; l'epiteto deriva dalla popolazione dei Marsi.

4.5.10 L'importanza

L'*Acero campestre* è una delle poche specie europee molto diffusa ed indigeno in tutti i paesi europei eccetto la Scandinavia e la Finlandia. E' piuttosto raro nel sud della Spagna e del Portogallo; appare nel nord Africa e nella fascia ovest dell'Asia. Cresce piuttosto di rado in zone montane poiché di norma vive in pianura, sui rilievi più dolci, nelle steppe e lungo le rive dei fiumi e come sottobosco in foreste di latifoglie. Linneo descrive per la prima volta *Acero campestre* nel 1753. Grazie alla sua ampia diffusione l'*A. campestre* presenta numerose forme geografiche un tempo considerate specie distinte, subspecie, varietà o forme. Molte di queste espressioni sono state ridotte a sinonimi o sono al momento riconosciute come cultivars. L'*acero campestre* difficilmente può essere confuso con altre specie con la possibile eccezione del giapponese *Acer miyabei* che ha foglie simili sebbene più ampie, e l' *A. hyrcanum* che presenta foglie più o meno simili ma non produce lattice.

Referenze: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), Hillier (1965), de Jong (1976), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Linnaeus (1753), Murray (1970c), Pax (1902), ReHder (1986 facs.)

4.6 *Acer platanoides* spp. *platanoides* L. (1753)

Sezione *Platanoidea* Pax (1885)

4.6.1 Sinonimi

A. platanifolium Stokes (1812)

A. lactescens Steudel (1821)

A. rotundum Dulac (1867)

A. laetum var. *cordifolium* Kanitz (1880)

A. dasyphyllum Nicholson (1881)

A. dobrudschae Pax (1886)

A. fallax Pax (1886).

4.6.2 Tipo

LINN #1225.11, "*Habitat in Europa boreali*"

4.6.3 Nomi comuni

Acero riccio, acero norvegese

4.6.4 La morfologia

Albero, longevo, alto fino a 30 metri tanto quanto ampia la sua chioma circolare ad ombrello, con denso fogliame e con fusto dritto, slanciato e cilindrico: il portamento appare molto simile a q

Le foglie, pa
superiore, un pò
opposte, i lobi s
20 cm, generalm
(Fig. 56). La bas



enti sulla pagina
g. 50). Caduche,
lungo da 6 cm a
succo lattiginoso

Fig. 50. Foglia di *Acer platanoides* (Foto Baskauf).



Fig. 51. Inserzione dei piccioli fogliari di *Acer platanoides* (Foto Baskauf).



Fig. 52. Corimbo di *Acer platanoides* ssp. *platanoides*
(Foto Virginia Tech Dendrology).

Presenta un'infiorescenza a corimbo (Fig. 52) più o meno eretto; i fiori sono verde-giallo crema e presentano un'evoluzione, generalmente in Aprile (Fig. 60 c), anticipata rispetto alla fogliazione.



Fig. 53. Disamare di
Acer platanoides
(Foto Baskauf)

Le cultivar con foglie rosse presentano fiori rossi (K 5, C 5, A 5, G (2)).

I giovani rami presentano gemme terminali.

Le gemme (Figg. 54a e 55), grosse, ovoidali, con perule di un colore rosso scuro, presentano una macchia verde oliva alla base, a margine finemente ciliato mentre nel resto della superficie risultano glabre; le gemme laterali sono appressate sul ramo.

I frutti sono disamare a carpelli appiattiti e con ali molto divaricate. La singola samara presenta una lunghezza da 4 a 7 cm, ben sviluppata, triangolare (Figg. 53 e 54 (c)).

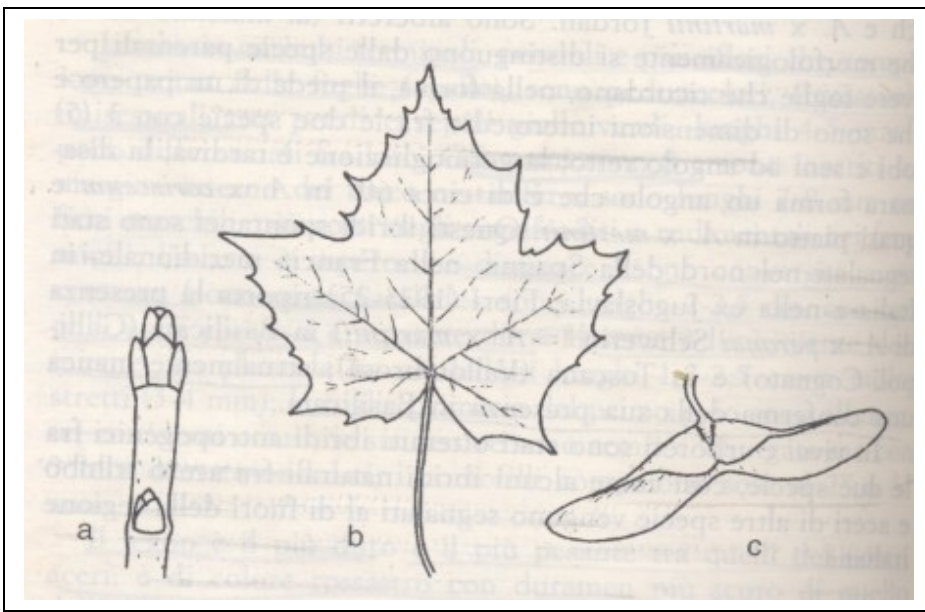


Fig. 53

Fig. 54

Fig. 55

Fig. 54. (a) Gemma, (b) foglia e (c) frutto di *Acer platanoides*; l'angolo compreso fra le samare è di 180°. (Gellini e Grassoni, Botanica Forestale).



Fig. 55. *Acer platanoides*. (Gellini e Grassoni, Botanica Forestale).

Fig. 56. *Acer platanoides*. Fuoriuscita di lattice.



Fig. 57. *Acer platanoides*. Corteccia

La corteccia è di colore variabile dal verde al marrone (Fig. 57).

Fig. 58. Legno di *A. platanoides*

Fig. 58

lata
one



Il legno è molto simile a quello dell'Acero montano ma risulta di minor pregio anche se ne
 Fig. 59. Distribuzione di *A. platanoides* in Europa. (Immagine [www. lui rig.altervista.org](http://www.luirig.altervista.org)).

4.6.5 L' areale

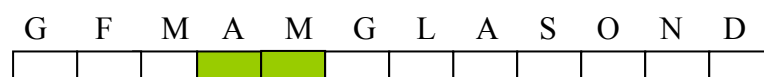
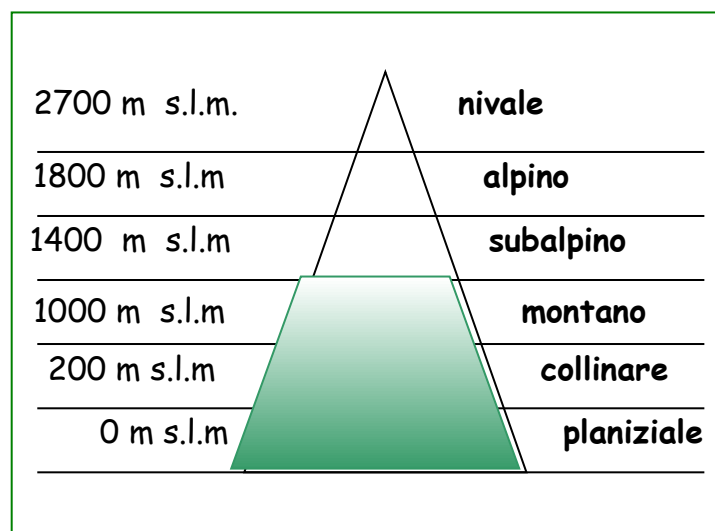
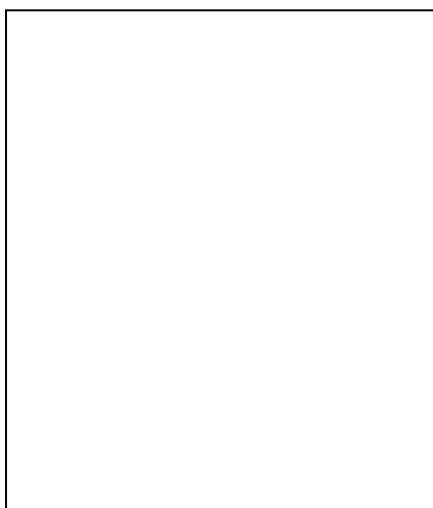


Fig. 60. a) *Acer platanoides* in Italia; b) distribuzione altitudinale di *A. platanoides*; c) periodo di antesi di *Acer platanoides*. (mappe luirig.altervista.org).

a)

b)

c)

a) E' una specie rinvenibile attraverso il nord Europa, in Svezia e Norvegia fino a Tromsø dove l'habitus diventa arbustivo; in Finlandia fino al 62° di latitudine, in Russia e negli Stati Baltici tanto a nord fino a Lago Ladoga e tanto a sud fino a spingersi nel Caucaso senza però attraversare gli Urali. Presente in Europa centrale (Fig. 59) e nei paesi costieri del continente nonostante sia ampiamente coltivato sia lì che in Nord America.

In Italia rappresenta una specie di secondaria importanza data la sua scarsa diffusione. Presente in piccoli gruppi in boschi montani termofili di faggio, abete rosso, di cerro, da 0 a 1300 m s.l.m. (Fig. 60 b) nelle regioni centro-settentrionali e centrali della penisola sino alle Marche e l'Umbria (Fig. 60 a); cresce bene nelle valli con terreni profondi, freschi, non acidi.

4.6.6 La storia

Acer platanoides è una delle poche specie europee presenti in questa sezione; è ampiamente conosciuto anche per essere stato coltivato per secoli. Linneus lo descrive per la prima volta in *Species Plantarum* (1753). Non può essere confuso facilmente con altre specie di Acero. Dal

punto di vista tassonomico le specie più prossime sono *A. cappadocicum* e *A. mono* ma nessuna delle due presenta un margine significativamente dentato come *A. platanoides*. La produzione di un lattice fogliare costituisce un elemento distintivo di questa specie da tutti gli altri aceri ad eccezione delle specie afferenti alla stessa Sezione *Platanoides* ed alla Serie *Macrophylla* della Sezione *Lithocarpa*.

4.6.7 L'ecologia

E' una specie mesofila, prospera nelle valli e nelle stazioni con terreni profondi, freschi, non acidi in un clima freddo-continentale. Risulta la specie più esigente in termini di terreno. Sporadicamente o a piccoli gruppi, interviene nella edificazione dei consorzi vegetali tipici del piano montano, in boschi montani termofili di faggio, di abete rosso, di cerro, etc. delle regioni settentrionali e centrali della penisola spingendosi fino alle Marche e all'Umbria. Per questo può considerarsi l'Acero dei climi freddi. E' rinvenibile anche nel piano basale dove tuttavia predilige le stazioni più fresche ed ombreggiate (Gellini e Grossoni, 1997). Manifesta una dormienza più profonda rispetto all'acero di monte in virtù della quale riesce a sfuggire ai rigori del freddo e ai danni delle gelate tardive. E' abbastanza esigente in luce ma durante la fase giovanile è sufficientemente tollerante dell'ombra. Si espande più ad est e a nord dell'acero di monte, ma in senso altitudinale rimane sempre al di sotto di questo. In Italia raggiunge quote massime di 1.300 m s.l.m. (Fig. 60 b) mentre l'acero di monte si spinge tra i 1.500 ed i 1.900 m s.l.m.

4.6.8 Numero cromosomico

$2n=26$ (Santamour 1965) e $2n=39$ (Darlington 1955)

4.6.9 Le sottospecie

A. platanoides ssp. *platanoides*, sottospecie tipica: presente in Crimea e Caucaso, è una pianta di grandi dimensioni con foglie ampie e pentalobate con remoti ma netti lobi. Questa specie è frequente in forma coltivata in tutte le città europee, impiegata per scopi ornamentali o per le alberature stradali.

Risulta il migliore portainnesti per tutte le sue cultivar e per tutte le altre specie della stessa Sezione.

A. platanoides ssp. *turkestanicum* (Pax) de Joung, comb. & stat. nov. : dal Turkestan e Afghanistan è piuttosto raro, apparentemente molto simile ma diagnosticamente differente dal suo parente più prossimo, la sottospecie *platanoides*. Presente in Crimea e Caucaso.

Rimane tuttavia da sottolineare che nei tempi più recenti diversi autori hanno descritto numerose varianti sia dal punto di vista geografico che morfologico. Al momento attuale tutte queste nomenclature sono state ridotte a sinonimi.

4.6.10 L'importanza

Anche *Acer platanoides* è stato oggetto di un miglioramento per scopi ornamentali e numerose varietà sono state selezionate per il portamento, per la forma delle foglie o per il loro colore.

Referenze: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), de Jong (1976), Koch (1869), Krüssmann (1976 a), Linnaeus (1753), Murray (1970 c), Ottolander et al. (1979), Pax (1902), Pojárkova (1933 b) Rehder (1986 facs.).

4.7 *Acer cappadocicum* ssp. *lobelii* (Tenore) Murray (1982)

Sezione ***Platanoidea***

4.7.1 sinonimi

A. *platanoides* var. *integrilobum* Tausch (1829)

A. *platanoides* var. *lobelii* (Tenore) Loudon (1838)

A. *lobelii* ssp. *Tenorei* Pax (1886)

A. *lobelii* f. *normale* Schwerin (1893)

4.7.2 Tipo

Michele Tenore, boschi montuosi intorno al Golfo di Napoli. Olotipo NAP. Isotipo W.

4.7.3 I nomi comuni

Acero napoletano, Acero di Lobel, Acero lobato.



Fig. 61



Fig. 62

Fig. 61 e 62 . Foglie di *Acer cappadocicum* spp. *lobelii*
(Foto adrianosofo.splinder.com e parcomajella.it)

4.7.4 La morfologia

L'acero di Lobel o acero napoletano, è un albero con chioma non particolarmente espansa; un portamento colonnare (Fig. 63)., raggiunge anche i 20 m di altezza. Negli individui più giovani la corteccia è verde, lucida e liscia, con chiare striature longitudinali; successivamente assume colore bianco cinereo (Fig. 65).

Le foglie (Figg. 64 e 66 b) sono più consistenti di *Acer platanoides*, i cinque lobi sono interi ma terminanti con punta acutissima; l'ampiezza fogliare raggiunge anche i 12-15 cm e sono di un intenso verde. Il picciolo lungo mediamente da 6 a 10 cm è rosso sulla pagina inferiore ed emette un lattice.



Fig. 63. Portamento colonnare di *Acer lobelii* (foto Maples of. The World).





conten
I f
E'

molto simili a quelle dell'acero riccio

Fig. 65. Corteccia di *Acer lobelii* (Foto www.viaggiarenelpollino.com)



Fig. 67. Disamara di *Acer lobelii* (Foto www.viaggiarenelpollino.com)

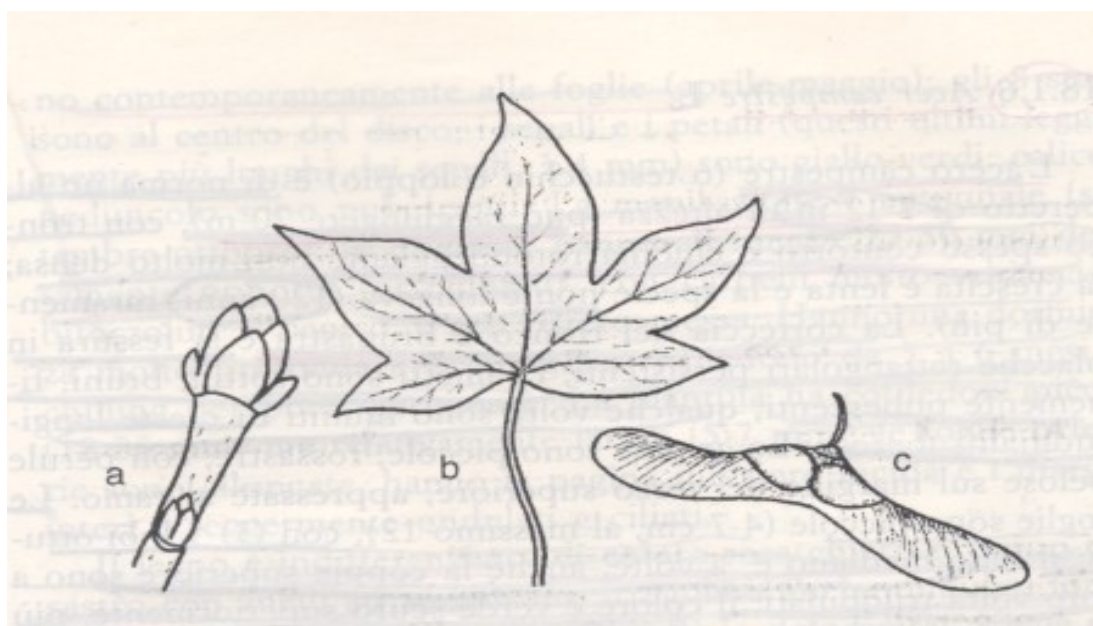


Fig. 66 . (a) Gemma, (b) foglia e (c) frutto di *Acer lobelii*; l'angolo compreso fra le samare è di 180°. (Gellini e Grossoni, Botanica Forestale).

4.7.5 L' areale

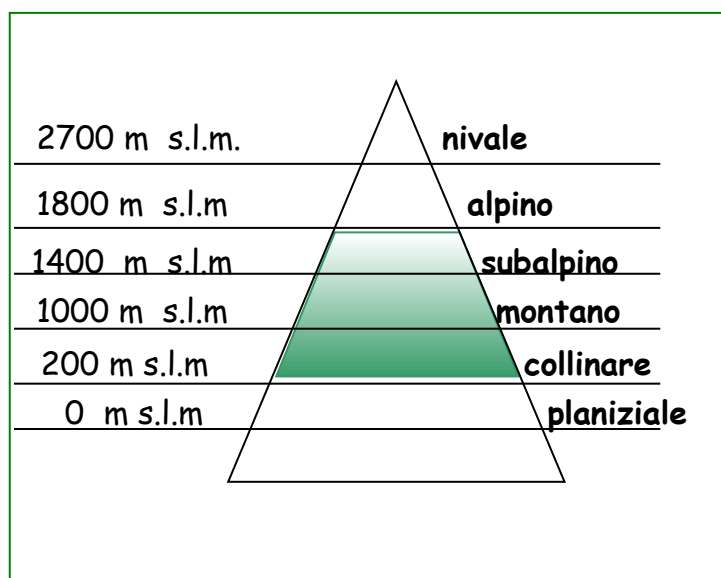
E' una specie endemica dell'Abruzzo, della Campania, della Basilicata e della Calabria. Vive nelle stazioni montane o submontane caratterizzate da terreni profondi e freschi e da abbondante piovosità. Boschi da 750-1700 m s.l.m. (Figg. 68 e 69 b). In Italia si ritrova sull'Appennino meridionale dal Sannio (M. di Mezzo) alla Campania (Montevergine, Alburno, Taburno, Cervialto), in Basilicata, (Vulture, Balvano, Muro, S. Severino, Pignola, Arioso), sul Pollino e sulla Sila (Fig. 69 a).

Fig. 68. Distribuzione di *Acer lobelii* in Europa. (www.luirig.altervista.org).





a)



b)

Fig. 69. a) *Acer lobelii* in Italia; b) distribuzione altitudinale di *A. lobelii*; c) periodo di antesi di *Acer lobelii*. (mappe lui.rig.altervista.org).

4

L'epiteto proviene dal botanico francese Matthias de L'Obel (1538-1616). E' una specie endemica dell'Appennino meridionale, Campania, Basilicata e Calabria. Secondo Murray e de Jong è da considerare una sottospecie di *A. cappadocicum* Gleditsch ma sia il Pignatti che Flora Europea conservano per questo *taxon* il rango di specie. Talvolta è stato considerato in passato una varietà del meglio conosciuto *A. platanoides* e considerato un ibrido.

4.7.7 L'ecologia

In Italia si riscontra nelle seguenti associazioni boschive :

- Faggeta di Lucania con acero (Aceri Lobelii-Fagetum) Aita, Corbetta e Orsino (1984)

Stazione: pendii montani e altopiani

4.7.8 Il numero cromosomico

$2n = 26$

4.7.9 L'importanza

In virtù della sua capacità di produrre polloni radicali, viene utilizzato per il consolidamento di terreni franosi.

Referenze: Bean (1970), Dippel (1982), Elwes & Henry (1908), Grootendorst (1969), Koch (1869), Krussman (1976°), Murray (1970c, 1977), Rehder (1986 facs.)

4.8. *Acer peronai* (*A. monspessulanum* x *A. opalus*) Schwerin 1901

Sezione Acer

4.8.1 Sinonimi

***Acer* x *Martinii* Jordan (1852)**

A. monspessulanum var. *quinguelobum* Willkomm & Lange (1893)

A. monspessulanum f. *martinii* (Jordan) Rouy Foucald (1897)

A. paui Marcet (1906)

A. parrierei Chabert (1909)

A. guinieri Chabert (1910)

A. *hyrcanum* sensu Faurel Maire ex Quezel Santa (1963), non Fischer & Meyer.

3.8.2 Tipo

C. Martin; LY

4.8.3 Sinonimi Bosc ex Tausch (1829) (*A. monspessulanum* x *A. opalus* ssp. *obtusatum*)

Acer x coriaceum

A. creticum sensu F. Schimdt (1792), non L.

A. parvifolium Tausch (1829).

A polymorphum Spach (1834), non Siebold & Zuccarini.

A x duretti Willkomm (1879), nomen nudum.

A dealbatum Dieck (1887)

A trilobatum hort. Ex Kew (1894), non Michaux.

4.8.4 L'epiteto

Coriaceus o *Martinii* dopo Claude Martin (1731- 1800) Un missionario francese in India.

4.8.5 La morfologia

E' un piccolo albero deciduo a forma di fungo, di altezza variabile da 8 m a 10 m con molte e robuste branche di colore variabile dal rosso-bruno al grigio; rami giovani debolmente glabri e talvolta leggermente appiccicosi.



Fig. 70

Le foglie sono trilobate, talvolta lievemente pentalobate, di ampiezza 3-10 cm, verde brillante, coriacee; i lobi si presentano ottusi e arrotondati con margine occasionalmente crenato, più o meno serrato (Figg 70, 71 e 72). Il picciolo fogliare è lungo da 3 a 5 cm, glabro sulla pagina inferiore.

La fogliazione è piuttosto attardata.

Figg. 70, 71 e 72. Giovani rami e fogli di *Acer peronai* (*acer x coriaceum*). (Foto Atonie van der bos).

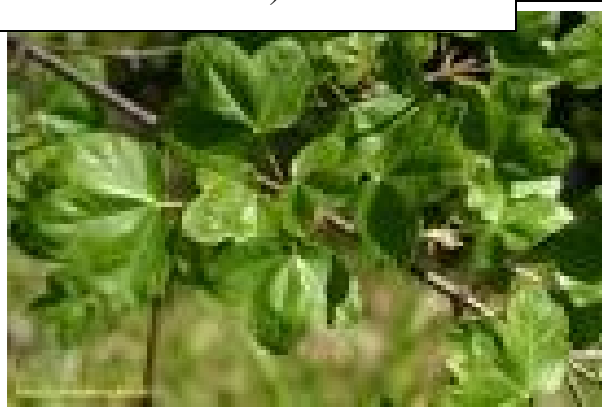


Fig. 71



Fig. 72

Fig. 73. Corteccia di *Acer peronai*.

Le infiorescenze sono corimbose e terminali. I fiori, pentameri sono giallo-verdi (K 5, C 5, A 5, G (2)).

Le samare sono glabre, lunghe circa 2,5 cm con ali lunghe circa 1 cm divergenti di circa 60°.

La corteccia (Fig. 73) si presenta grigia e liscia molto simile a quella di *Acer opalus*.

Le gemme, nerastre, si presentano piccole, numerose ed unite insieme.

4.8.6 L' areale

Ritrovato originariamente nel sud dell'Europa specialmente in Croazia e Bosnia – Erzegovina è originario della costa della Dalmazia e della Croazia, è presente anche nel sud della Francia. E' considerato il prodotto dell'ibridazione fra *Acer monspessulanum* e *A. opalus* e non di *Acer pseudoplatanus* e *Acer monspessulanum* come ricordato dalla precedente letteratura. Esso infatti manifesta chiaramente le caratteristiche di entrambe le specie parentali ma non sembra presentare alcuna influenza da parte di *Acer pseudoplatanus*; in particolare nella corteccia, nelle gemme e nell'habitus è possibile riconoscere una chiara verosimiglianza con *A. opalus*.

E' tuttavia difficilmente confondibile con altri aceri, solo le forme a foglia più ampia di *Acer obtusifolium* sono piuttosto simili; *Acer monspessulanum*, presenta foglie di forma analoga ma molto più piccole mentre le foglie di *Acer opalus* non sono mai tanto lucenti e chiaramente lobate. Tausch (1829) provvide alla descrizione del sinonimo *Acer parvifolium*. Ci sono numerosi altri sinonimi tra i quali quello più vicino ad *Acer peronai* risulta essere *Acer creticum*.

Per la sua natura ibrida, ovviamente *Acer peronai*, non può essere riprodotto per seme.



Fig. 74. Distribuzione di *Acer peronai* Schwerin sin. di *Acer x coriaceum* *Acer x martinii* in Italia (a); periodo di antesi di *Acer peronai* sin. di *Acer x coriaceum* (b).
(www.luirig.altervista.org).

4.8.7 La storia

L'epiteto Martinii è stato attribuito a tale specie in onore di Claude Martin (1731 – 1800), un missionario Francese vissuto in India. Questo ibrido è attualmente considerato un sinonimo di *Acer x coriaceum* del quale presenta infatti le stesse specie parentali.

4.8.8 L'ecologia

Questa specie è attualmente presente in particolar modo nel nord della Spagna, a sud della Francia, sull'Appennino in Italia ed in Jugoslavia dove le due putative specie parentali si sovrappongono. Il sinonimo *Acer martinii* non è stato ad oggi ritrovato né in forma coltivata né spontanea pertanto il confronto con materiale fresco di *Acer x coriaceum*, *Acer bornmuelleri* e *Acer x duretti* non è possibile.

4.8.9 L'importanza

Ideale da coltivare in piccoli giardini, ha valore soprattutto ornamentale. E' un albero di notevole valore, molto poco conosciuto in forma coltivata.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Murray (1970 c), Pax (1902), Rehder (1986 facs.), Schneider (1912).

4.9 *Acer negundo* L. (1753) spp. *negundo*

Sezione *Negundo* (Bohemer) Maxim.

4.9.1 I sinonimi

Negundo aceroides Moench (1794)

Negundium fraxinifolium Rafinesque (1808) *nomen nudum*

Negundo fraxinifolium (Stokes) DC. (1824).

Acer trifoliatum Rafinesque (1836).

Acer lobatum Rafinesque (1836)

Acer negundo ssp *typicum* Wesmael (1890)

Acer negundo ssp. *vulgare* (Pax) Scherni (1893).

Rulac negundo (L.) Hitchcock (1894)

Acer fauriei Lévêillé (1906).

Rulac nuttallii Nieuwland (1911)

Acer orizabense (Rydberg) Standley (1923)

4.9.2 Tipo

LINN 1225. 7; LINN, “Habitat in Virginia.”

4.9.3 I nomi comuni

Acero americano, Acero bianco.

L’epiteto *Negundo*, vecchio generico nome di acero, è stato utilizzato da J. Ray nel 1668 e deriva dalla similarità con *Vitex negundo*. Esistono numerosi sinonimi dovuti alla variabilità delle foglie ed all’ampio areale di distribuzione.

4.9.4 La morfologia

Gli individui di questa specie presentano un *habitus* deciduo o arbustivo; l'albero vanta una crescita rapida e presenta talvolta più di un tronco di altezza compresa fra i 12 e i 20 m solo occasionalmente più alto. Le branche si presentano fragili e completamente glabre.

Le foglie sono cartacee e presentano da tre a sette lobi ovati raramente anche nove, lunghe da 5 a 10 cm e di ampiezza compresa fra tre e cinque cm. Il colore fogliare va dal verde grigio oliva al verde chiaro, i margini fogliari sono solo debolmente dentati. Il picciolo è lungo da sei a dieci cm (Figg. 76 e 77).

Le infiorescenze sono laterali. I singoli fiori, di un pallido verde, sono dioici; i fiori maschili (Fig. 75 b), solitamente in gruppi di quattro manifestano gli stami di color rosso porpora. I fiori femminili (Fig. 75 a) sono riuniti in racemi lungamente penduli (K 5, C 5, A 5, G (2)). L'impollinazione è anemofila. L'antesi in aprile e maggio (Fig. 81 c).



a)



b)

Fig. 75 Fiori femminili (a) e fiori maschili (b) di *Acer negundo*
www.piante-e-arbusti.it/foto/aceronegundo_fio-m.jpg

Fig. 76. Foglie composte di *A. negundo*.
www.piante-e-arbusti.it/foto/aceronegundo_fio-m.jpg



Fig. 76

Le samare sono di color giallo e raggruppate in lunghi grappoli molto spesso sterili; presentano ali quasi orizzontali, glabre.

Fig. 77. Foglie e infruttescenze di *Acer negundo*.



E' una specie abbastanza pollonifera dalle radici. Il legno ha proprietà e caratteristiche molto simili a quelle dell'acero riccio. E' chiaro, bianco crema tenero e leggero; non risulta comunemente infestato da parassiti. La corteccia non è durevole. Per questo infatti non è utilizzato in falegnameria.



Fig. 78. Corteccia di *Acer negundo*.
www.cas.vanderbilt.edu e www.duke.edu

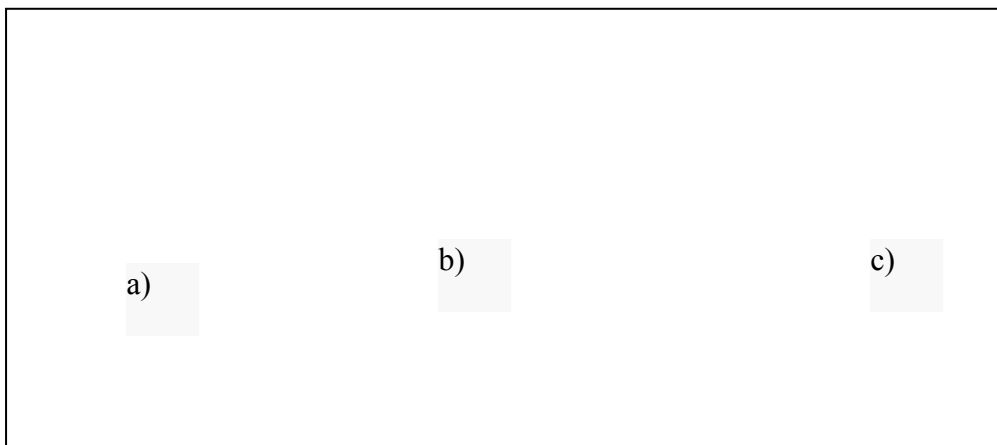


Fig. 79. (a) Samare, (b) ascella fogliare e (c) gemma di *Acer negundo* ssp. *negundo*. (Foto Maples of the world).

4.9.5 L'areale

Indigeno del Canada questo albero è spesso riconoscibile in immensi folti boschetti. Ampiamente coltivato in tutto il nord America, è una specie presente e naturalizzata anche nelle regioni più a est e nel centro degli Stati Uniti, sul versante occidentale delle Montagne rocciose e nel sud GUA



Fig. 80. Distribuzione di *Acer negundo* in Europa.

a)

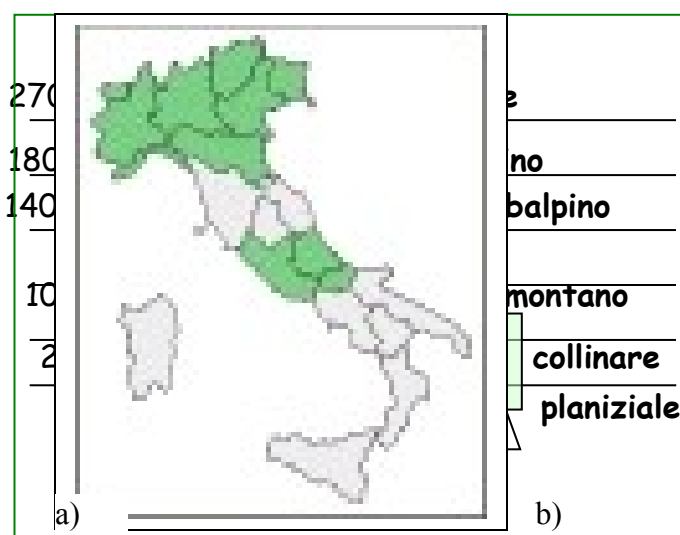


Fig. 81 a) *Acer negundo* in Italia; b) distribuzione altitudinale di *Acer negundo*; c) periodo di antesi di *Acer negundo*. (mappe lui.rig.altervista.org).

4.9.6 La storia

E' un acero nordamericano della Sezione *Negundo* con foglie composte e fiori unisessuali; è una specie dioica. Il termine “negundo” trova origine in un termine indiano utilizzato da

Linneo per indicare *Vitex negundo* L., avente foglie molto simili a quelle di questo acero. E' stata introdotta verso la fine del XVII sec. Pignatti segnala per l'Italia un suo probabile inselvaticamento.

4.9.7 L'ecologia

E' un albero caratterizzato da una rapida crescita. E' molto diffuso nel Nord America dove è ampiamente piantato come in Europa ed è ormai naturalizzato anche in larghe aree della Cina e dell'America centro-meridionale. Vegeta quasi ovunque nel piano basale. E' una specie molto eliofila che preferisce suoli umidi e profondi ma si adatta anche a suoli poveri. Pur prediligendo un clima temperato, resiste comunque alla siccità ed alle gelate. Manifesta una buona capacità di adattamento a qualsiasi tipo di terreno. Se solitari, gli individui femminili producono solitamente una gran quantità di frutti partenocarpici. Dimostra un buon tasso di accrescimento.

E' una specie dioica e se piantata singolarmente gli individui femminili producono generalmente un'enorme quantità di frutti partenocarpici. Le branche sono fragili ed il legno di modesta qualità.

Non è facilmente confondibile con altre specie ad eccezione forse del giapponese *A. cissifolium* o del suo corrispondente cinese *A. henryi*, entrambi appartenenti alla stessa Sezione di *A. negundo* ma a Serie differenti. E' facilmente propagato per seme

4.9.8 Numero cromosomico

$2n = 26$ (Darlington 1955, Santamour 1965)

4.9.9 Subspecie

Acer negundo ssp. *californicum* (Torrey & Ray) Wesmael (1890)

Acer negundo ssp. *interius* (Britton) A. & D. Loeve (1954)

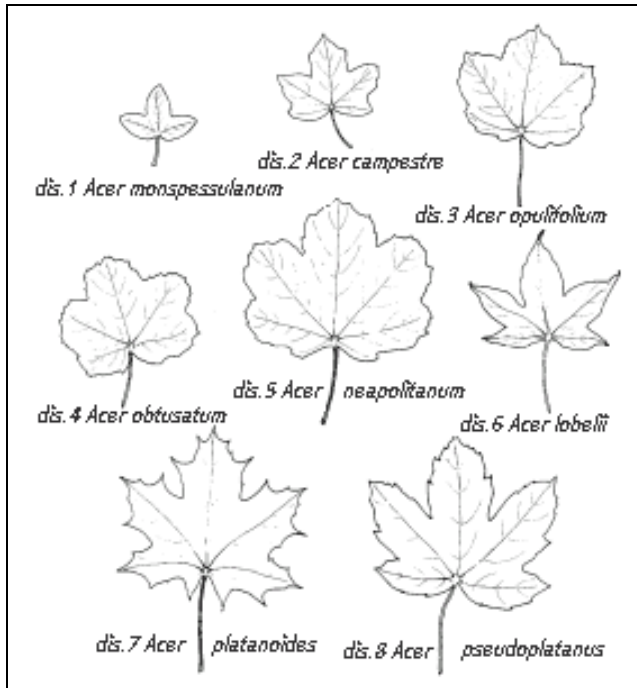
Acer negundo ssp. *mexicanum* (DC.) Wesmael (1890)

Acer negundo ssp. *negundo*

4.9.10 L'importanza

In virtù del bel fogliame è ampiamente utilizzato nei parchi come pianta ornamentale e per le alberature stradali. Ne esistono numerose varietà coltivate come quella con foglie variegata a margini chiari, ottenuta per mutazione gemmaria. E' possibile coltivarlo a cespuglio.

Riferimenti: Bean (1970), Dippel (1892), Elwes & Henry (1908), de Jong (1976), Koch (1869), Krussmann (1976 a), Linnaeus (1753), Murray (1970 c), Pax (1902), Pojarkova (1933 b) Rehder (1986 facs.).



CHIAVE PER LA DETERMINAZIONE DEGLI ACERI ITALIANI

Per una rapida determinazione delle specie di Acero presenti in Italia, viene riportata una breve chiave semplificata che si basa sulle foglie (modificata da *Pignatti*).

Per utilizzarla bisogna leggere le due descrizioni contraddistinte con la stessa lettera e seguire quella che é simile alla foglia della pianta di cui vogliamo determinare la specie.

- A - Lamina con 3 lobi e 3 nervi principali - *Acer monspessolanum* (dis.1)
- A - lamina con 3-5 lobi e 5 nervi principali.
- B - Lamina lunga meno di 10 cm.
- C - Lobo apicale compreso tra 2 incisioni lunghe 1/2-2/3 della nervatura centrale - *Acer campestre* (dis. 2)
- C - Lobo principale compreso fra incisioni lunghe 1/6-1/7 del nervo.
- D - Foglie glabre o quasi di sotto - *Acer opulifolium* (dis. 3)
- D - Foglie tomentose di sotto - *Acer obtusatum* (dis. 4)
- B - Lamina lunga 10-16 cm.
- E - Foglie tomentose di sotto ed apice ottuso - *Acer neapolitanus* (dis. 5)
- E - Foglie glabre di sotto o quasi ad apice acuto.
- F - Lobi interi sui lati terminanti in punte acutissime (5.30°) - *Acer lobelii* (dis. 6)
- F - Lobi dentati sui lati e apice meno acuto (45°-90°)

G - Lobo apicale compreso fra due incisioni lunghe $1/4-2/5$ del nervo centrale;

1-3 denti laterali lunghi fino ad 1 cm e rivolti in fuori - *Acer platanoides* (dis. 7)

G - Lobo apicale compreso fra due incisioni lunghe $1/2-2/3$ della lamina:

denti laterali numerosi, rivolti verso l'apice e brevi - *Acer pseudoplatanus* (dis. 8)

5. LA SISTEMATICA E LA GENETICA

5.1 La classificazione scientifica

Nelle scienze biologiche la classificazione è un concetto che si riferisce alle modalità con le quali i biologi categorizzano, sistemano e raggruppano le varie entità al cui fondamento si trovano i concetti di specie, di organismo vivente e fossile.

La classificazione scientifica è un risultato delle scienze evolutive e deriva in parte cospicua dalla tassonomia o sistematica oltre che da tutti gli studi e le ricerche condotte per indagare sui viventi, sia dalla biologia sia da altre discipline scientifiche.

Con il termine *tassonomia* (dal greco *taxis* = ordine e *nomos* = regole) ci si può riferire sia alla classificazione gerarchica di concetti, sia al principio stesso della classificazione. Praticamente tutti i concetti, gli oggetti animati e non, i luoghi e gli eventi possono essere classificati seguendo uno schema tassonomico. La *tassonomia* o *sistematica* o *biotassia* costituisce quella branca della botanica e si occupa genericamente dei modi di classificazione, sulla base dei caratteri morfologici e sessuali, degli esseri viventi e non; essa si basa sull'esperienza e sul giudizio dei tassonomi e prende in considerazione soprattutto le somiglianze e le differenze morfologiche, oltre a quelle embriologiche, degli organismi esaminati.

La moderna tassonomia ancora si poggia saldamente sulla classificazione dei vegetali in base alle somiglianze e differenze emergenti dalla loro osservazione, sistema già proposto da John Ray (1627-1705) nel suo *Historia plantarum* e poi ulteriormente sviluppato da Carolus Linnaeus (Linneo). Questi, che con la pubblicazione del *Systema naturae* nel 1735, cercò di riunire le specie in base alle caratteristiche morfologiche condivise, apportò l'innovazione di trasformare il concetto di specie in una realtà pratica grazie all'introduzione della nomenclatura binomiale; questa metodologia era già stata anticipata da Teofrasto, Plinio il Vecchio, Gaspard

Bauhin e Tournefort ma Linneo fu il primo ad applicarle in un vero e proprio progetto sistematico.

Questi raggruppamenti furono ininterrottamente riesaminati e rimaneggiati perfezionandoli, fino a quando essi furono riletti secondo le teorie evoluzioniste di discendenza filogenetica proposte da Charles Darwin. Successivamente infatti, subentrò la consapevolezza che la specie non costituisce un'entità immutabile, sempre uguale a se stessa, bensì può evolversi dando origine ad altre specie, via via più complesse e meglio adattate all'ambiente in cui sono portate a vivere.

Si giunge così all'idea che tutti gli organismi viventi abbiano avuto origine da un unico primitivo organismo capostipite; si sancisce così il passaggio della sistematica ad una nuova fase tendente a mettere in evidenza la derivazione delle specie e delle altre categorie sistematiche le une dalle altre.

Si introduce quindi un approccio filogenetico allo studio degli organismi e della loro evoluzione spazio temporale. Per riconoscere le somiglianze e le differenze fra le piante, o gli animali, sono presi in considerazione non più uno o pochi caratteri ma vengono proposti esami biochimici, citologici e genetici al fine di costruire veritieri alberi genealogici.

5.2 La sistematica molecolare.

Il termine **sistematica molecolare** significa sistematica su basi macromolecolari ossia l'esame del DNA e del RNA per rintracciare le relazioni tra gli organismi (Judd *et. al.* 1999).

Le osservazioni molecolari hanno rivoluzionato la nostra visione delle relazioni filogenetiche ed i risultati che esse producono vengono ampiamente utilizzati per formulare diverse ipotesi filogenetiche.

In alcuni casi i dati molecolari hanno confermato la monofilia di gruppi che erano già stati riconosciuti sul piano morfologico, in altri hanno consentito di discriminare fra ipotesi contraddittorie; in altri ancora hanno consentito di dare una giusta collocazione a quei *taxa* le cui relazioni di parentela non risultavano chiare.

Tutti gli studi filogenetici condotti su base molecolare sono realizzati utilizzando come strumenti sia le mappe genomiche che le sequenze di DNA. Lo studio delle sequenze di DNA rappresenta la chiave di lettura per rispondere ai quesiti della sistematica vegetale e la

progressiva padronanza delle tecniche di genetica molecolare è stata la chiave di volta di questo sviluppo. Infatti, la possibilità di esaminare e quantificare le variazioni contenute nel patrimonio genetico degli individui ha permesso di predisporre “etichette” la cui individuazione e riconoscimento ci consente di studiare i meccanismi evolutivi in atto (mutazione, migrazione, deriva genetica, pressione di selezione) in individui, gruppi e specie, e di valutare i diversi fenomeni che vi contribuiscono (flussi genici, colli di bottiglia, ibridazioni, adattabilità).

Per botanici, zoologi, conservazionisti, climatologi e geologi risulta ormai evidente che la storicizzazione delle informazioni genetiche raccolte in studi comparati, associata allo studio delle cause e modi di formazione/fluttuazioni di areali, delle relazioni tra *taxa* di aree geografiche distanti e tra endemismi, o tra gruppi evolutisi in maniera concertata, come pure i tempi e modi di colonizzazione/estinzione di un territorio da parte di certe specie, o comunità vegetali, risultano di fondamentale importanza per ottenere risposte complete alle loro ricerche.

Allo stesso modo, altre scienze come l’archeologia, la paleobotanica, la paleoecologia e la paleoclimatologia possono beneficiare di questi contributi o fornire ulteriori strumenti per decifrare le cause e le modalità di nascita di specie e *formae*, della costituzioni di areali, delle direzioni e dei tempi di migrazione delle specie stesse, fino all’interpretazione dell’evoluzione dei paesaggi e biomi (Pitelka, 1997).

L’incontro fra le “scienze della vita”, le “scienze della terra”, la tassonomia e la genetica molecolare e l’interazione tra loro, consentono di acquisire una più ampia dimensione storica e spaziale, la sola che possa permettere una razionale applicazione di principi e metodi per la conservazione dell’ambiente, e che consenta di formulare modelli attendibili utili a previsioni future.

5.3 I genomi vegetali.

La cellula vegetale contiene tre genomi diversi: quello contenuto nel cloroplasto, nel mitocondrio e nel nucleo. I sistematici hanno utilizzato dati derivanti da tutti e tre. I primi due sono in genere di origine uniparentale (soprattutto materna nelle angiosperme) mentre il nucleo è di derivazione biparentale.

Il genoma del mitocondrio, costituito da alcune centinaia di migliaia di coppie di basi di DNA (200-2500 kbp), circolare, si riordina frequentemente così che la stessa cellula può

presentarne molte forme riarrangiate. Ciò significa che i riarrangiamenti del genoma avvengono così spesso all'interno degli individui vegetali che esso non può differenziare specie o gruppi di specie e non risulta pertanto utile a dedurre relazioni di parentela fra gli individui.

Al contrario, il cloroplasto risulta stabile sia nelle cellule che nelle specie manifestando riarrangiamenti piuttosto rari nell'evoluzione; pertanto risulta un utile strumento per separare gruppi importanti. Anche l'introduzione o la perdita di geni, o di loro introni, risultano sufficientemente frequenti tanto da essere ricercati ma sono altrettanto rari da poter costituire dei marker stabili di cambiamento evolutivo.

Nel genoma nucleare si presume che l'ordine dei geni sia stabile, almeno all'interno della specie e possa risultare stabile anche tra gruppi di specie.

5.4. Gli strumenti della sistematica molecolare.

Lo stato di avanzamento della ricerca sulla sistematica molecolare è condizionato dalla disponibilità e dall'accessibilità di tecniche adeguate che ampliano il ventaglio della quantità e qualità di dati sistematici tratti dagli acidi nucleici (Hillis et.al. 1996; Soltis et al. 1997, 1998; Crawford 1990; Myamoto e Carcraft 1991). Pertanto, fino all'invenzione del DNA ricombinante la sistematica molecolare risultava solo scarsamente disponibile, fu semplificata con il miglioramento delle tecniche di sequenziamento e fece un balzo in avanti con l'introduzione della PCR.

5.4.1 La PCR. La Reazione a Catena della Polimerasi.

Questa tecnica di biologia molecolare consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici dei quali siano note le sequenze iniziali e terminali. Questo tipo di moltiplicazione, provvede alla sintesi di un segmento di DNA completo a partire da un filamento a singola elica. Il procedimento, grazie all'intervento enzimatico della DNA polimerasi, consente la ricostruzione del filamento mancante a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti in corretta successione, complementare a quella già esistente.

5.4.2 Generare i dati molecolari

5.4.2.1 La mappatura genica

La maggior parte degli studi molecolari fu inizialmente condotta attraverso l'analisi dei siti di restrizione. Questa tecnica può essere utilizzata per generare mappe di singoli geni o di interi genomi. Buona parte delle attuali conoscenze sui genomi di cloroplasti e mitocondri proviene da studi questo tipo.

5.4.2.2 Sequenziare i geni.

Il sequenziamento del DNA in riferimento ai geni, parti di essi o di regioni non codificanti sta diventando sempre più comune ed è ora una tecnica largamente impiegata in sistematica. Il sequenziamento consente di determinare l'ordine preciso dei nucleotidi in un tratto di DNA. Il fattore limitante l'applicazione di questo metodo è sempre stata la disponibilità del DNA in quantità sufficiente da poter essere analizzato. L'utilizzo dei batteri per la replicazione dei geni secondo una metodica piuttosto laboriosa fu successivamente sostituito dall'introduzione della PCR. La rapidità di questo metodo ha consentito ai sistematici di studiare la stessa regione in molte specie di un particolare gruppo.

Virtualmente tutti gli studi filogenetici su base molecolare sono realizzati utilizzando come caratteri sia le mappe gnomiche che le sequenze del DNA. Al fine di indagare le variazioni a carico delle sequenze di DNA, utili per rispondere ai quesiti che attengono alla sistematica vegetale, si seleziona un segmento particolare del genoma sia esso nucleare o cloroplastico, che presenti un sufficiente tasso di mutazione e che sia correlato ad una variazione tassonomica utile. In seguito si procede all'amplificazione del frammento desiderato per poi sequenziarlo successivamente mediante un metodo chimico o enzimatico (González, 1997; Vogler y Monaghan, 2006).

Le nuove tecnologie dei sequenziatori automatici utili a generare sequenze di DNA hanno facilitato notevolmente le ricerche in questo ambito. Una fra queste è il sequenziamento ciclico.

Attualmente i geni del nucleo che codificano per l'RNA ribosomale sono stati utilizzati con buon esito per chiarire le relazioni filogenetiche. Di particolare interesse risulta la regione che comprende i due spaziatori interni di restrizione ITS1 e ITS2 che sono risultati utili a fornire

una serie di informazioni per rispondere a quesiti di carattere filogenetico nelle angiosperme anche indipendentemente dalle ipotesi formulate su evidenze morfologiche o in base ad esami del genoma cloroplastico. (Baldwin *et al.*, 1995 ; Soltis & Soltis, 1998).

Il frammento ITS (Internal Transcribed Spacer) è un marcatore genetico ampiamente utilizzato nella biosistemica e nella filogenesi di molteplici *taxa* vegetali e animali. Le regioni ITS sono mediamente variabili e presentano un indice di conservazione adeguato per indagini a livello di piccole famiglie e di grandi generi (Suh *et al.*, 1993; Kim Jansen, 1994) Questi geni sono disposti in tandem e comprendono da cento a mille coppie consecutive.

Molti studi filogenetici hanno utilizzato il DNA dei cloroplasti (Olmstead e Palmer 1994; Sytsma e Hahn, 1997) come le sequenze del gene *rbcL*, quelli della subunità F della NADP deidrogenasi (*ndhF*, nella piccola regione a copia singola), quelli per le subunità α e β della RNA polimerasi II (*rpoA* e *rpoC2*, nella grande regione a copia singola), un gene della maturasi dell'introne che separa la regione codificante di *trnK* (*matK*) e *atpB*, il gene che codifica la subunità β della ATP sintetasi.

5.5 Il DNA barcoding

Sono molteplici i metodi di analisi della variabilità molecolare; tra le tecniche più tradizionali e più usate per l'analisi del DNA come RFLP, RAPD, microsatelliti e AFLP, per citare le più usate, la moderna biologia molecolare propone metodologie più innovative come il **DNA barcoding**.

Il DNA barcoding è una sistema proposto da Hebert *et al.* (2003) che vuole classificare le specie attraverso l'uso di una corta e ben definita sequenza di DNA denominata DNA barcode. La sequenza barcode deve possedere caratteristiche ben precise: una bassa variabilità intraspecie ed una alta variabilità interspecie, la presenza di siti di ancoraggio dei primers altamente conservati, semplice analisi di sequenza dei dati (limitata presenza di indel).

L'utilizzo di informazioni di tipo molecolare per scopi tassonomici o filogenetici è abbastanza diffuso, ma ciò che distingue questa tecnica da tutte le altre è che si vuole arrivare ad una standardizzazione del metodo. Questo significa individuare una adeguata sequenza barcode a cui applicare un protocollo veloce, economico, riproducibile e quindi di facile diffusione, in tutti i laboratori del mondo.

La tecnica del barcoding nasce come strumento per l'esplorazione della biodiversità, sia intesa come classificazione di specie già note sia di quelle ancora da classificare (1,7 milioni di specie descritte contro le 10-100 milioni stimate), ma la possibilità di poter classificare

facilmente la specie anche utilizzando materiale quali semi, polline, radici, foglie, larve, peli e altro ancora, ha aperto la strada ad ulteriori applicazioni. Alcuni esempi sono:

- il controllo delle specie invasive ossia specie che spesso raggiungono paesi diversi dalla loro origine attraverso il trasporto ormai globale delle merci e che possono provocare danni sia a livello di alterazione degli ecosistemi sia a livello economico produttivo

- analisi medico legali su frammenti di varia natura

- classificazione di specie criptiche cioè quelle specie simili, se non identiche, morfologicamente che poter essere distinte hanno bisogno di altri approcci diagnostici.

L'interesse del mondo scientifico, ma non solo, ha portato nel maggio 2004 alla costituzione del Consortium for the Barcode of Life (CBOL <http://www.barcoding.si.edu/>) con lo scopo di coordinare, sviluppare e catalizzare tutti gli aspetti e le applicazioni di questa tecnica e attualmente sono oltre 150 le strutture (tra pubbliche e private) che hanno aderito al progetto.

Per la maggior parte delle specie animali, la regione di 648bp del gene mitocondriale COI è stata individuata come sequenza barcode. Il suo utilizzo ha permesso l'identificazione a livello di specie per molti gruppi tassonomici tra cui uccelli, pesci e farfalle. Purtroppo il gene COI delle piante non possiede le stesse caratteristiche evolutive del regno animale, infatti il DNA mitocondriale vegetale è caratterizzato da un basso valore di divergenza di frequenza, e frequenti riarrangiamenti.

Dunque, altre regioni sia del genoma nucleare che cloroplastico, sia codificanti che non codificanti, sono state studiate al fine di individuare il o i tratti di DNA che meglio contribuiscono alla funzionalità del barcode, ma il problema è apparso subito di non facile soluzione. Una delle prime regioni indicate come potenziale barcode è stata la regione spaziatrice ribosomiale nucleare (ITS), già ampiamente utilizzata in filogenesi, ma la presenza di copie multiple divergenti presenti in individui di alcuni generi ha limitato il suo utilizzo.

Si è quindi pensato di valutare con maggiore attenzione il genoma del cloroplasto che presenta alcuni vantaggi rispetto a quello nucleare:

- è aploide (n) ed ereditato nelle angiosperme (salvo poche eccezioni) per via materna (Petit e Vendramin, 2005).

- è presente in alto numero di copie e quindi più facilmente amplificabile come avviene nei mitocondri

- è altamente diagnostico, infatti pur essendo relativamente conservato possiede regioni altamente informative.

Numerose regioni del cloroplasto, sia codificanti sia non codificanti, sono state studiate, ma nessuna, singolarmente, si è rivelata sufficiente per ottenere adeguate percentuali di successo nella discriminazione a livello di specie.

Per questo si è deciso di passare ad un approccio che utilizzi più locus contemporaneamente (intendendo per locus sia le regioni codificanti che non codificanti). In particolare si è osservato che l'associazione di una regione codificante (quale potrebbe essere il gene *rbcL*) ed una non-codificante (quale il *trnH-psbA*) potrebbe essere una soluzione vincente. Infatti, la regione codificante, più conservata evolutivamente, potrebbe agevolare la discriminazione a livello di genere e famiglia, mentre quella non-codificante, con la sua maggiore velocità evolutiva sarebbe in grado di discriminare meglio a livello di specie. Addirittura l'informazione potrebbe essere ulteriormente potenziata con l'utilizzo di un terzo locus da scegliere tra le altre regioni cloroplastiche.

Infatti, in occasione della Second International Barcode of Life Conference in Taipei tenutasi nel Settembre 2007, differenti regioni o combinazioni di esse, di seguito elencate, sono state proposte da differenti gruppi di ricerca:

RBG Kew *et al.*: *rpoC1* + *rpoB* + *matK* o *rpoC1* + *matK* + *trnH-psbA*

Kim *et al.* : *matK* + *atpF-H* + *psbK-I* or *matK* + *atpF-H* + *trnH-psbA*

Kress *et al.*: *rbcL* + *trnH-psbA*

6. MATERIALI E METODI PER LE ANALISI MOLECOLARI

6.1 Individuazione delle popolazioni.

Lo studio si è incentrato sull'analisi delle specie del genere *Acer* naturali in Italia. Le specie che sono state esaminate sia sotto il profilo morfologico che quello molecolare sono quelle di seguito elencate.

Per ogni popolamento sono indicati il Comune e la Provincia di provenienza.

La raccolta del materiale vegetale è stata effettuata di persona o dal personale del Dipartimento di tecnologie, ingegneria e scienze dell'Ambiente e delle Foreste (D.A.F.) dell'Università degli studi della Tuscia o grazie alla collaborazione del personale di altri Enti (Parco Nazionale della Majella, Parco Naturale dei Monti Aurunci).

Per ciascuna di esse è indicata la località di provenienza.

Acer pseudoplatanus – Campo di Giove (AQ)

Acer platanoides – Cittaducale (RI)

Acer campestre – S. Eufemia (PE)

Acer campestre – Alviano (TR)

Acer campestre – Umbertide (PG)

Acer monspessolanum – Pacentro (AQ)

Acer monspessolanum – Uta (CA)

Acer obtusatum – Pretoro (CH)

Acer obtusatum – Viterbo (VT)

Acer obtusatum – Campo di Giove (AQ)

Acer lobelii – Pescocostanzo (AQ)

Acer lobelii – Rosello (CH)

Acer peronai - Pieve S. Stefano (AR)

Acer peronai - Firenze (FI)

Acer negundo – Viterbo (VT)

Per ogni popolamento, al termine delle osservazioni morfologiche, è stato prelevato il materiale da sottoporre all'analisi genetica. Sono stati prelevati rametti di circa 20 cm con foglie verdi e gemme nuove per ciascun albero, e per ogni popolamento sono stati campionati 5 - 10 individui distanti almeno 50-1000 m.

Il materiale di ogni individuo è stato posto in sacchetti di plastica sigillati per garantirne una più duratura conservazione. Tutti i popolamenti sono stati georiferiti mediante GPS. Prima di procedere all'estrazione del DNA il materiale vegetale è stato liofilizzato.

6.2 La scelta dei marcatori molecolari

Gli studi di Biosistemica Molecolare in campo vegetale utilizzano principalmente sequenze provenienti dal genoma cloroplastico, con l'unica concorrenza cominciata negli ultimi anni di sequenze provenienti da nrDNA (ITS) (Baldwin, 1992; Álvarez and Wendel, 2003).

Nei primi studi il cpDNA veniva studiato attraverso il polimorfismo dei siti di restrizione (Olmstead and Palmer, 1994), ma con l'avvento delle tecnologie di sequenziamento sono iniziati gli studi comparativi tra i geni e l'accumulo dei dati di sequenza (Zurawski and Clegg, 1987).

Moltissimi studi hanno utilizzato il gene *rbcL* in particolare a livello intergenere (Chase et al., 1993) seguito dall'esplorazione di altri geni come *ndhF* (Olmstead and Sweere, 1994), *atpB* (Hoot et al., 1995), e *matK* (Johnson and Soltis, 1994).

Al contempo le regioni cloroplastiche non codificanti sono state studiate per verificare relazioni tassonomiche a livelli più bassi, assumendo che queste regioni siano sottoposte a minori costrizioni funzionali rispetto alle regioni codificanti, e quindi dovrebbero fornire un maggiore livello di variazione utile per le analisi filogenetiche (Gielly and Taberlet, 1994).

Sulla base di queste premesse e a partire dai marcatori attualmente indicati come possibili candidati come sequenza barcode e già precedentemente citati, (Pennini, 2007) abbiamo scelto tre regioni cloroplastiche (*trnH-psbA*, *rpoC1* e *rbcL*) e la regione nucleare ITS che, sebbene in parte abbandonata, potrebbe invece possedere interessanti caratteristiche (Tab. 1).

6.3 Descrizione delle regioni cloroplastiche utilizzate

Tra le regioni cloroplastiche sono stati scelti 3 frammenti:

- rbcL
- rpoC1
- trnH-psbA

6.3.1 rbcL

Questo gene rbcL del DNA cloroplastico, codifica per la subunità grande dell'enzima ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), è il più importante accettore di carbonio in tutti gli eucarioti fotosintetici e nei cianobatteri. Questo gene è stato scelto per la sua universalità nell'ambito vegetale (fanno eccezione solo gli organismi vegetali parassiti), per la sua discreta lunghezza (1428 bp), perché non presenta problemi di allineamento. E' stato il primo e sicuramente uno dei più utilizzati marcatori in studi filogenetici nell'ambito di generi e famiglie. La scelta di questo gene nasce dalla sua ampia diffusione e la sua natura altamente conservativa, sebbene in un recente lavoro venga indicato come soggetto a selezione positiva nella maggior parte delle piante terrestri (Kapralov e Filatoy, 2007).

6.3.2 rpoC1

Il gene cloroplastico rpoC1 insieme a rpoC2, costituiscono la regione rpoC che si trova localizzata nella regione LSC (Large Single Copy) del genoma plastidiale nella maggior parte delle Angiosperme (Hudson et al 1988). Questi 2 geni, insieme a rpoB codificano le tre subunità della cpRNA polimerasi. Il gene rpoC1 è interrotto da un singolo introne nella maggior parte, ma non in tutte, le piante terrestri.

Anche questo gene è stato ampiamente utilizzato per studi filogenetici, sebbene con limitati successi nella risoluzione di livelli tassonomici più bassi (Downie *et al* 1996).

6.3.3 trnH-psbA

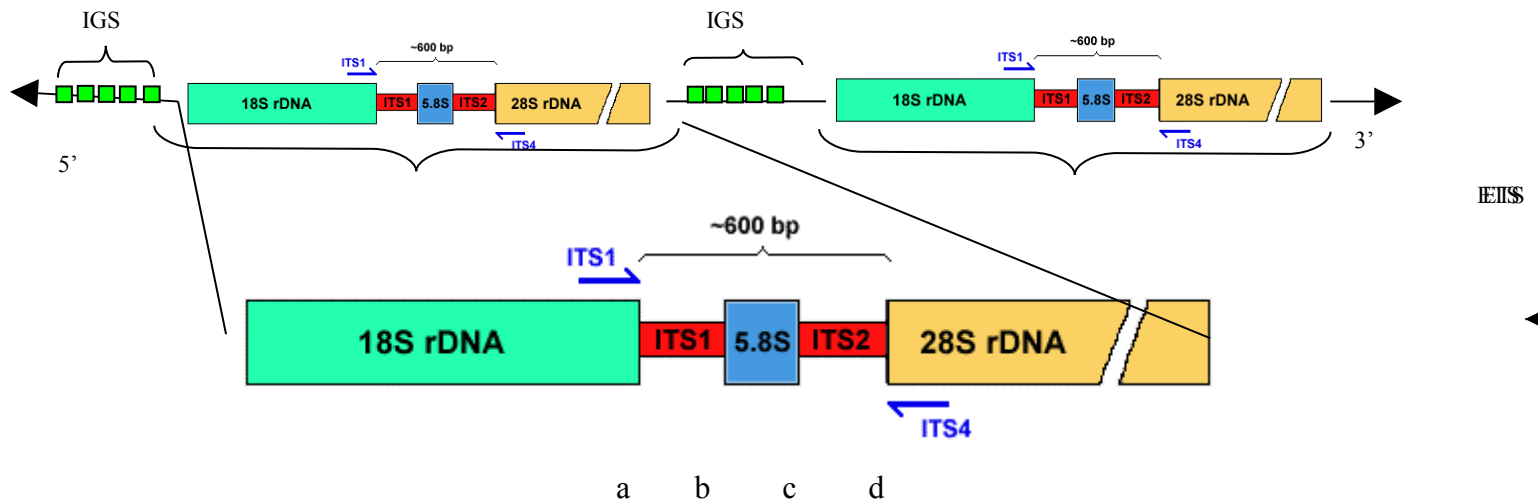
Gli studi su questa regione cominciarono con Aldrich (Aldrich *et al.*, 1988) che mostrò come fosse caratterizzata da inserzioni e delezioni (indel) anche tra specie vicine. Studi successivi hanno mostrato il suo valore a livello sistematico (Sang *et al.*, 1997) evidenziando anche la sua alta variabilità rispetto a *matK* e *trnL-trnF*. La sua utilità è stata anche mostrata da Hamilton (1999b) e Holdregger and Abbott (2003) che la hanno utilizzata anche per studi intraspecie. Purtroppo la sua alta variabilità rende difficile il suo allineamento a livelli più alti (intergenere) (Laurales: Renner, 1999, Saxifragaceae: Soltis *et al.* 2001, Lecythidaceae: Hamilton *et al.*, 2003). Sebbene diversi studi abbiano mostrato che *trnH-psbA* contenga un alto numero di siti variabili (Azuma *et al.*, 2001, Hamilton *et al.*, 2003) questa regione è usualmente accoppiata con altre regioni a causa della sua lunghezza che è mediamente di 465 bp (Shaw *et al.* 2005) e quindi potrebbe non possedere caratteri sufficienti per costruire una filogenia ben risolta. Queste caratteristiche, oltre al fatto di essere facilmente amplificabile e sequenziabile nei diversi *taxa*, ne hanno determinato il suo largo utilizzo e ne hanno fatto una delle regioni candidate a diventare “sequenza barcode” per le specie vegetali (Pennini, 2007).

6.3.4 Lo spaziatore trascritto interno ribosomale ITS

Il DNA ribosomale del genoma nucleare degli eucarioti è costituito da una unità trascrizionale ripetuta in tandem centinaia di volte (Fig. 82). La sequenza ITS è una sequenza spaziatrice situata fra i geni degli RNA ribosomali 18S (subunità minore) e 26S (subunità maggiore). Inoltre essa consiste nel gene per l'RNA ribosomale 5,8 S; all'interno di questa zona si riscontrano regioni spaziatrici di trascrizione di piccole dimensioni; esse si trovano a monte (ITS1) e a valle (ITS2) dello stesso gene ribosomale 5,8S per un totale di circa 600 paia di basi (bp) nella maggior parte degli organismi. ITS1 e ITS2 sono due spaziatori trascrizionali interni che separano le regioni codificanti 18S, 5,8 S e 26S. Oltre all'appropriato tasso di variabilità, gli ITS presentano anche vantaggi di natura sperimentale: essi, infatti, appartengono al DNA ribosomale nucleare che costituisce una frazione abbondante del DNA totale; inoltre sono compresi fra le regioni di DNA altamente conservate (18S, 5,8S e 26S). Entrambe le caratteristiche permettono, di norma, una facile amplificazione attraverso la PCR, mediante l'uso di primers quasi universali che riescono a fornire prodotti di amplificazione sequenziabile dalle alghe verdi alle monocotiledoni.

Ciascun complesso formato dai tre geni risulta separato dal successivo da uno spaziatore di maggiori dimensioni definito come spaziatore intergenico grande o IGS. Queste sequenze molto ripetute sono soggette a processi di omogeneizzazione; ciò implica che qualora si

verificasse una mutazione, questa si propagherebbe in tutte le unità. Ciò vuol dire che tutte le copie delle sequenze risultano molto simili fra loro rispetto alle copie presenti in altre specie (Baldwin *et al.* 1995; Maggini *et al.*, 1995).



- a. 5'- GGA GAA GTC GTA ACA AGG TTT CCG-3'
- b. 5'- ATC CTG CAA TTC ACA CCA AGT ATC G-3'
- c. 5'-TTG CAG AAT CCC GTG AAC CAT CG-3'
- d. 5'-CCA AAC AAC CCG ACT CGT AGA CAG C-3'

Fig. 82. Struttura dell'unità ripetuta dei geni ribosomali vegetali e la sequenza dei primers utilizzati per l'amplificazione delle regioni ITS1 e ITS2 (Aceto *et al.* 1999) IGS: spaziatore intergenico; ITS : regione spaziatrice di trascrizione interna; ETS: regione spaziatrice di trascrizione interna.

Primer	ITS1
5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	
Primer	ITS4
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

La localizzazione del frammento ITS fra geni altamente conservati (18S e 26S) permette l'utilizzo di primers uguali tra specie diverse o organismi diversi (primers universali).

L'elevata ripetizione nel genoma nucleare delle piante, in un solo locus del cromosoma o in molteplici loci, fa sì che questa regione spaziatrice sia facilmente individuabile, amplificabile, clonabile e sequenziabile rendendola così un prezioso strumento per gli studi filogenetici.

Sono note numerose tecniche molecolari impiegate per l'identificazione degli ibridi in differenti specie vegetali (Heuertz et al., 2006; Perron et al., 2000; Gonzáles, 1998); recenti studi filogenetici che prevedono l'impiego degli spaziatori interni di trascrizione (ITS) hanno dimostrato una stretta correlazione fra le sequenze della regione spaziatrice e la specie esaminata. Ciò giustifica l'uso di queste regioni spaziatrici per determinare o confermare la paternità degli ibridi (Doyle & Doyle, 1988; Rieserberg *et al.* 1990).

Gli spaziatori trascrizionali interni, sono ampiamente utilizzati per risolvere le relazioni filogenetiche sia in campo vegetale che animale, sia a diversi livelli tassonomici (sia inter specie che intra specie)

Nel nostro studio è stato utilizzato per intero lo spaziatore ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2).

Prima di procedere all'estrazione del DNA, il materiale vegetale è stato liofilizzato.

6.4 La liofilizzazione del materiale

Per poter essere sottoposte alla liofilizzazione, le foglie sono state tagliate in frammenti di piccole dimensioni, facendo attenzione ad eliminare tutte le parti eventualmente danneggiate e le nervature. Sono state poi sottoposte a trattamento di preraffreddamento a -20°C ed infine liofilizzate per circa 24 ore. I campioni liofilizzati sono stati ridotti ulteriormente in polvere mediante l'uso di un pestello e di un mortaio e l'aggiunta di una minima quantità di sabbia di quarzo al fine di ottimizzare la polverizzazione del materiale vegetale e di conseguenza anche l'estrazione del DNA.

La liofilizzazione è un procedimento tecnologico di disidratazione di un tessuto organico; il notevole interesse per questa forma di disidratazione è giustificato dalla natura non invasiva del metodo che si basa sul processo di sublimazione: durante questo passaggio di stato l'acqua infatti passa direttamente dallo stato solido allo stato di vapore.

Il passaggio dell'acqua dallo stato solido a quello aeriforme si verifica infatti solo in due situazioni: quando la pressione viene mantenuta costante, un innalzamento della temperatura corrisponde ad un passaggio dallo stato solido a quello aeriforme attraverso lo stato liquido; in condizioni di temperatura costante, mediante una diminuzione della pressione, al di sotto del

punto triplo, si ha il diretto passaggio allo stato di vapore (Fig. 83). Dal punto di vista biochimico e citologico quest'ultima condizione consente di ottenere la disidratazione dei tessuti vegetali senza incorrere in un'alterazione delle strutture cellulari in seguito a fenomeni degenerativi associati ad un innalzamento termico. In questo risiede una duplice utilità: quella di ottenere un materiale vegetale integro per le sue caratteristiche biologiche e idoneo ad affrontare un processo conservativo a lungo termine.

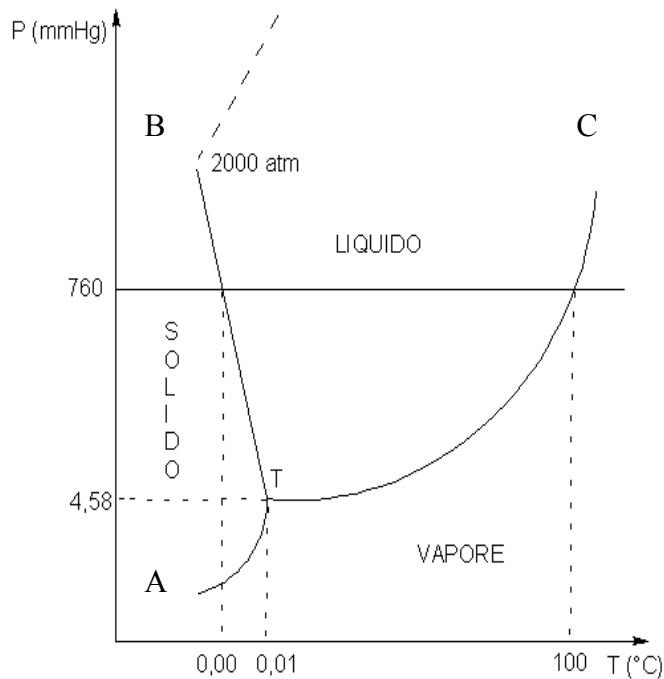


Fig. 83 Diagramma di stato. La sublimazione si verifica esclusivamente in determinate condizioni di temperatura e pressione.

AT = curva di coesistenza della fase solida e della fase di vapore acqueo. Sono rappresentati i valori di temperatura e pressione che consentono la sublimazione.

TC = curva di coesistenza fra la fase liquida e la fase di vapore. In queste condizioni si verificano i processi di evaporazione - condensazione.

TB = curva di coesistenza della fase solida e della fase liquida. Si verificano i passaggi di stato di fusione e solidificazione.

T = punto triplo di coesistenza delle fasi solido - liquido - vapore.

La liofilizzazione dei campioni di Acero esaminati nel corso del presente lavoro è stata condotta mediante l'impiego di uno strumento (FreeZone 2,5 Liter – Labconco) costituito da due elementi principali:

- la pompa per il vuoto, indispensabile per creare le condizioni di pressione (0,133 mBar) essenziali per lo svolgimento del processo di sublimazione;
- un collettore necessario ad assicurare la raccolta e la separazione del vapore acqueo estratto dal campione; a questo scopo il collettore esercita un brusco raffreddamento del vapore esercitando una temperatura di circa -45°C . Il vapore così condensato viene raccolto e definitivamente separato dal resto del materiale disidratato (Fig. 84).



Fig. 84 Il liofilizzatore

Esistono altri parametri che devono essere verificati prima di procedere alla liofilizzazione del campione: la temperatura di congelamento del materiale stesso, il suo spessore, la superficie di contatto con l'aria. Tutti questi fattori incidono sulla velocità e sul successo della liofilizzazione secondo una relazione inversamente proporzionale.

6.5 Workflow - tre livelli operativi

STEP 1

Test dei primers proposti da CBOL:

Estrazione del DNA

Amplificazione del del DNA cloroplastico e del DNA ribosomale

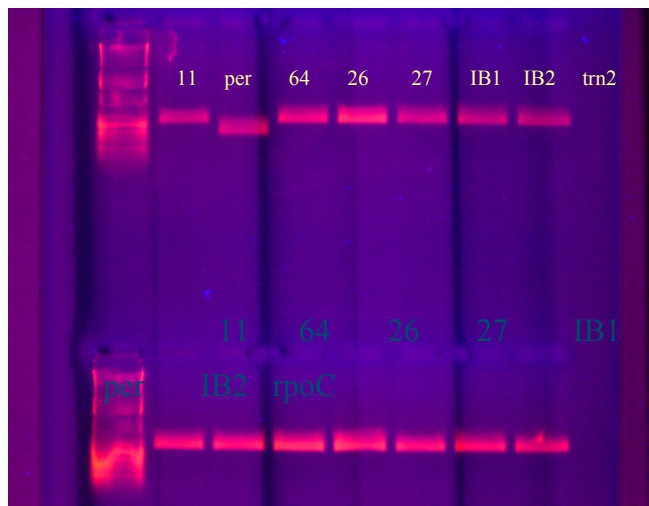


Fig. 85. Corsa elettroforetica su gel di agarosio di alcune sequenze amplificate mediante l'impiego dei primers trnH-psbA e rpoC. Ciascun numero rappresenta diverse sequenze afferenti alle sette specie di *Acero* esaminate.

STEP 2

In questa fase si è proceduto al sequenziamento e alla produzione delle sequenze.

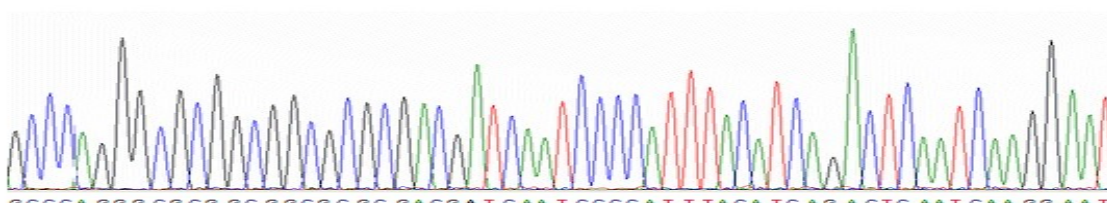


Fig. 86. Esempio di elettroferogramma di sequenza

STEP 3

L'analisi dei dati di sequenza:

- Analisi dei parametri generali di polimorfismo;
 - La valutazione della percentuale della divergenza intraspecifica
 - Esame del potere discriminante a livello di specie
- a) Metodo Clustering
 - b) Metodo Similarità

STEP 1

6.5.1 L'estrazione del DNA

Il DNA totale (genomico e organellare) di ciascun individuo è stato estratto dal tessuto fogliare liofilizzato. Il DNA è stato estratto e purificato con il sistema DNAeasy Plant Mini Kit (Quiagen) che prevede l'impiego di vari tamponi e di due diverse colonnine "Microspin" per la purificazione dell'acido nucleico. La procedura di estrazione del DNA a partire da 20 mg di liofilizzato ha percorso le seguenti fasi: lisi cellulare; digestione mediante l'uso di RNAasi A; precipitazione e filtrazione dei residui cellulari, il legame del DNA ad una colonna a scambio molecolare, successivo lavaggio della colonna ed eluizione del DNA estratto.

Le fasi in dettaglio:

- **La lisi cellulare:** 30 mg di liofilizzato tissutale sono stati trasferiti in un tubo da microcentrifuga della capacità di 2,0 ml dove sono stati aggiunti 400 µl del Buffer AP1 (soluzione di lisi).
- **Digestione con RNAasi:** al fine di evitare delle contaminazioni di RNA, sono stati aggiunti 2 µl di enzima per campione. Dopo l'omogeneizzazione della mix contenuta nel tubo su vortex, si è proceduto con l'incubazione a 65°C per 10 minuti.
- **Precipitazione dei residui cellulari:** a fine incubazione, sono stati aggiunti 130 µl di Buffer AP2 (Soluzione di precipitazione); omogeneizzando la mix per inversione e mantenendo i campioni in ghiaccio per 5 minuti, si è favorita la precipitazione del detergente, delle proteine e dei polisaccaridi; i campioni sono stati successivamente centrifugati in una microcentrifuga per 5 minuti alla massima velocità (13.000 rpm) al fine di allontanare i residui cellulari;
- **Filtrazione dei residui cellulari:** il sovranatante prelevato è stato posto su un tubo da 2,0 ml provvisto di colonna per filtrazione (QIAshredder Minispinn) e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti; a fine centrifugazione è stata scartata la colonna su cui si sono depositati i residui cellulari mantenendo il filtrato all'interno del tubo;
- **Legame del DNA ad una colonna a scambio molecolare:** al filtrato, ottenuto dalla precedente fase, si sono aggiunti 700 µl di Buffer AP3/E (diluito precedentemente con 60 ml di etanolo al 95%) , una soluzione contenente guanidina tiocianato in grado di creare le condizioni per legare il DNA alla colonna a scambio molecolare (Soluzione di legame); 700 µl della mix, omogeneizzata per inversione, sono stati prelevati e trasferiti in tubo da microcentrifuga di 2,0 ml fornito di una colonna in silice (Colonna di legame) e sottoposti a

centrifugazione per 1 minuto; tale operazione è stata ripetuta sulla restante mix utilizzando lo stesso tubo con colonna in silice e scartando il filtrato;

- **Lavaggio della colonna:** la colonna, la cui funzione è quella trattenere il DNA, è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW (soluzione di lavaggio, precedentemente diluita con 40 ml di etanolo al 95%) ed è stata eseguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto; scartando il filtrato, l'operazione è stata ripetuta con altri 500 µl della soluzione di lavaggio avendo cura che nessun residuo di questa fosse trattenuto dalla colonna;

- **Eluizione del DNA:** dopo il lavaggio la colonna è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; ad essa sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione di eluizione a basso contenuto salino (Buffer AE) lasciando incubare per 30 minuti a temperatura ambiente; è seguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto.

Il DNA, estratto col metodo descritto, può essere conservato nella soluzione utilizzata per l'eluizione per breve tempo a 4°C o, per lungo tempo, a -20°C.

6.5.2 Esame della quantità e della qualità del DNA estratto

In seguito all'estrazione, il DNA relativo ad ogni specie esaminata, è stato sottoposto ad un esame fluorimetrico per determinarne la quantità; a questo scopo è stato utilizzato un fluorimetro (Qubit™ Fluorometer – Invitrogen) (Fig. 87); infine il materiale è stato esaminato anche dal punto di vista qualitativo, mediante corsa elettroforetica (Fig. 85).

L'esame fluorimetrico si basa sulla proprietà che ha una soluzione colorante (Quant-it™ Reagent) di formare legami con l'adenina e la timina presenti nella molecola di DNA e di emettere fluorescenza. L'applicazione di questo metodo ci consente di determinare in maniera precisa la concentrazione del DNA presente nella soluzione rilevando la fluorescenza emessa dal quantitativo che ha interagito con il DNA. Prima di procedere all'esame di ogni singolo campione il fluorimetro è stato tarato mediante l'analisi di soluzioni di DNA standard che abbiano una percentuale di adenina e timina simile a quella prevista dei campioni da determinare quantitativamente. Al contrario dei metodi spettrofotometrici, le impurità che normalmente si possono ritrovare nel DNA (proteine, oligonucleotidi e solventi organici) non causano la minima influenza nella determinazione quantitativa del DNA.

Il fluorimetro fornisce il valore della concentrazione dei campioni espresso in µg/ml; tuttavia, tali valori corrispondono alla concentrazione dei campioni in seguito alla diluizione eseguita con la soluzione di analisi (Working Solution = Quant-it™ Buffer + Quant-it™

Reagent). Per il calcolo effettivo delle concentrazioni è stata, dunque, utilizzata la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione del campione} = \text{valore QF} \times (200/x)$$

Dove:

valore QF = valore fornito dal fluorimetro;

x = numero dei microlitri di campione aggiunti alla soluzione di analisi;

200 = volume finale (µl) dei campioni.

6.5.3 Risultati della lettura con fluorimetro

Tale metodica di quantificazione, tuttavia, non consente di avere informazioni relativamente al grado di integrità del DNA estratto.

Per questo la qualità del DNA estratto è stata verificata mediante elettroforesi su gel all'1% di agarosio. La polvere di agarosio è stata sciolta a caldo in tampone TBE 1X, con l'aggiunta di bromuro di etidio, una sostanza a struttura aromatica che intercalandosi nella doppia elica del DNA la rende visibile ai raggi ultravioletti. La soluzione così ottenuta è stata fatta gelificare su un apposito vassoio e con l'ausilio di un "pettine" sono stati prodotti dei pozzetti dove sono stati caricati 5 µl dei differenti campioni di DNA e un marcatore di peso molecolare (standard DNA molecular weight).

Il gel solidificato è stato posto in una cella elettroforetica (Fig. 88) contenente il buffer TBE 1X ed applicando agli elettrodi una differenza di potenziale elettrico di 80 V (d.d.p.) per circa 2 ore.

Al termine della corsa elettroforetica i campioni sono stati osservati mediante un transilluminatore a raggi UV, per stimare la concentrazione, il grado di pulizia e di integrità del DNA e procedere, quindi, con le indagini successive.



Fig. 87 Il fluorimetro

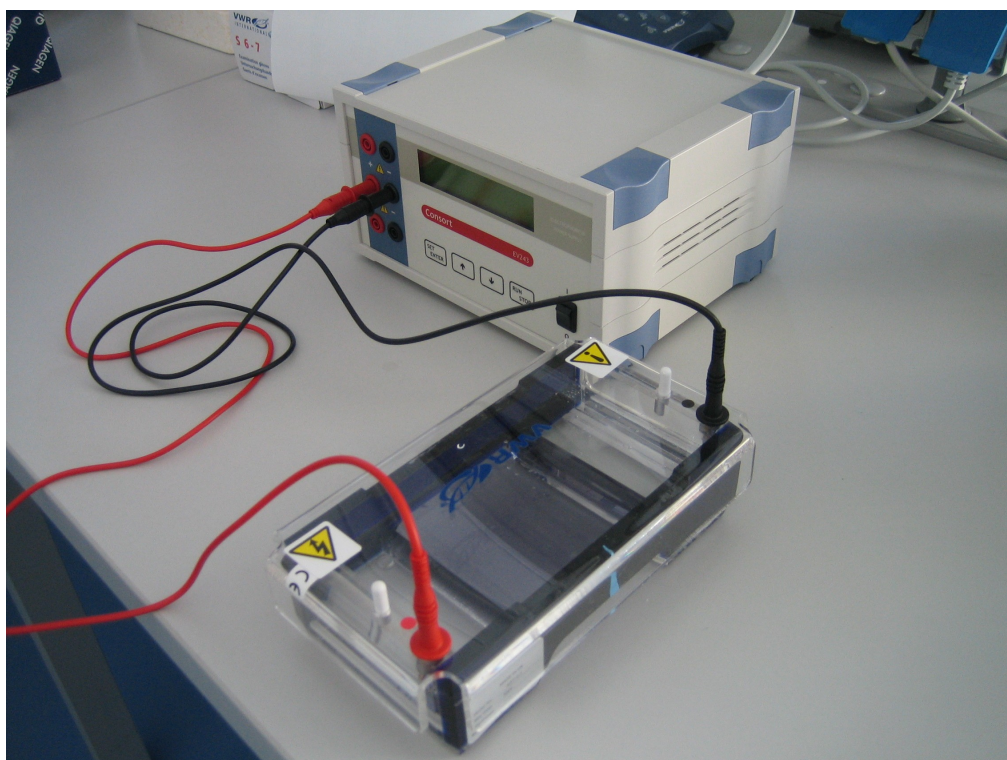


Fig. 88. Cella elettroforetica

6.5.4 Amplificazione del DNA cloroplastico e del DNA ribosomale

Le amplificazioni del DNA cloroplastico sono state realizzate con 3 coppie di primers.

L'amplificazione è stata condotta mediante la tecnica della "PCR" utilizzando un thermal cycler (termocicizzatore) Gene Amp PCR System 2400 della Perkin Elmer, attraverso le seguenti fasi:

1. amplificazione del frammento desiderato;
2. digestione del frammento con un enzima di restrizione;
3. separazione dei frammenti ottenuti su gel di Acrillamide.

Aliquote definite di DNA (50 ng) vengono fatte reagire con un preparato commerciale liofilizzato contenente tutti gli elementi necessari alla reazione di amplificazione (enzima TAQ polimerasi, tampone, deossinucleotidi) a cui sono stati aggiunti i *primers* (segmenti specifici di DNA di pochi nucleotidi) che hanno il compito di permettere l'innesco ed il termine della amplificazione della regione del DNA d'interesse, grazie alla loro complementarietà nelle regioni di inizio e fine trascrizione (estremità 5' e 3'). L'amplificazione, condotta nel termocicizzatore, ha previsto 35 cicli di reazione a catena, costituiti ciascuno da un trattamento denaturante della durata di 30' a 94°C, da una fase di appaiamento di ciascuna coppia di primers alle regioni omologhe e la produzione *in vitro* di nuove copie dei filamenti nucleari, identiche alle originali, ad opera dell'enzima Polimerasi..

Nel nostro caso, le reazioni sono state condotte in un volume finale di 25µl di cui 50 ng di DNA genomico, 20 ng di ciascun innesco per reazione, una dose di puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham) contenenti enzima, tampone e deossinucleotidi, ed acqua indispensabile a raggiungere il volume desiderato, che conterrà anche una concentrazione finale 1,5 mM di MgSO₄, necessario per il funzionamento della Polimerasi.

In tabella 2 sono riportate alcune informazioni relative al processo di termociclizzazione sui quattro primers utilizzati.

Tab. 1. Lista dei primers utilizzati nel presente studio, con relative fonti.

Barcode		primers	Ref.
trnH-psbA	f	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	CBOL
	r	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	
trnH-psbA(2)	f	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Shaw et al (2007)
	r	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	
rbclA	f	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	CBOL
	r	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCC	
rbclA (2)	f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	Kress et al. (2005)
	r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
rpoC1	f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CBOL
	r	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	

Tab. 2 – Protocollo per PCR

	Frammenti CLOROPLASTICI	ITS
STEP 1	94°C per 3 min.	98°C per 3 min.
STEP 2	94°C per 30 sec.	98°C per 1 min.
STEP 3	53°C per 30 sec.	58°C per 1 min.
STEP 4	72°C per 1 min.	72°C per 1 min.
STEP 5	go to STEP2, 35 times	go to STEP2, 35 times
STEP 6	72°C per 10 min.	72°C per 10 min.
STEP 7	4°C Forever	4°C Forever

Il volume finale è stato di 25 μ l di cui 50 ng di DNA genomico, 20 ng di primers per reazione, una dose di puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham) ed acqua quanto basta per raggiungere il volume desiderato, per raggiungere una concentrazione finale di 200 μ M di ciascun nucleotide e 1,5 mM di MgSO_4 .

Per verificare il successo della PCR e delle relative amplificazioni, è stata effettuata un'elettroforesi su gel d'Agarosio. La polvere di Agarosio è stata sciolta a caldo in tampone TBE 1X, con l'aggiunta di bromuro di etidio, una sostanza a struttura aromatica che intercalandosi nella doppia elica del DNA la rende visibile ai raggi ultravioletti. La soluzione così ottenuta è stata fatta gelificare su un apposito vassoio e con l'ausilio di un "pettine" sono stati prodotti dei pozzetti, in ognuno di essi sono stati caricati: 6 μ l di H_2O , 2 μ l di Blu di Bromofenolo e 2 μ l di DNA derivato dalla miscela di amplificazione.

Il gel solidificato è stato posto in una cella elettroforetica contenente il buffer TBE 1X ed applicando agli elettrodi una differenza di potenziale elettrico di 80 V (d.d.p.) per circa 30 min.

Al termine della corsa elettroforetica è stato possibile osservare, mediante un trasilluminatore a raggi UV, le bande di DNA, il loro grado di pulizia e di integrità.

STEP 2

6.5.5 Il sequenziamento

La lettura dei tracciati grezzi, detta anche identificazione delle basi (*base-calling*) ad oggi viene effettuata tramite un software che legge automaticamente le basi, allinea le sequenze simili e fornisce una base intuitiva per il lavoro di correzione di bozze (*editing*). Mentre leggono i tracciati, questi programmi assegnano punteggi di probabilità all'accuratezza d'identificazione di ciascuna base.

Le quattro tracce corrispondenti ai quattro spettri di fluorescenza sono fuse in un unico file, mantenendo le caratteristiche grafiche dei picchi. Al passaggio successivo il computer calcola il punto in cui si attende di trovare un picco, usando un procedimento di calcolo basato sulla distanza media tra i picchi in alcune regioni della sequenza. Gli algoritmi migliori sono in grado di effettuare aggiustamenti per l'aumento della distanza tra i picchi che avviene con l'avanzamento della corsa elettroforetica e per le variazioni locali nel contenuto di GC. In seguito, l'algoritmo rileva i valori massimi locali per ciascuna delle quattro serie di tracciati e controlla se ciascun picco ricade nello spazio previsto rispetto ai picchi adiacenti. Poiché non tutti i picchi sono della stessa altezza, per decidere se un picco è reale gli algoritmi usano di solito un valore soglia, che calcola la grandezza relativa di un minimo e massimo locale.

I risultati delle reazioni di sequenza sono stati visualizzati sotto forma di elettroferogrammi con il programma CHROMAS 2.1 (Technelysium), in cui la successione dei diversi picchi rappresenta la sequenza nucleotidica reale del DNA studiato (Fig. 86).

Le prime 30/50 basi di un elettroferogramma sono normalmente indistinguibili dal “rumore di fondo”, a causa della migrazione anomala di brevi frammenti di DNA che contengono agglomerati di coloranti. Inoltre i tracciati diventano progressivamente meno uniformi con l'avanzare della corsa: aumentano gli effetti della diffusione molecolare e contemporaneamente diminuiscono le differenze relative di massa tra frammenti successivi.

Poiché gli algoritmi automatici sovente commettono alcuni errori nell'identificazione delle basi, si è proceduto manualmente alla correzione delle sequenze.

Tutte le sequenze sono state verificate, controllate e assemblate con il programma DNAMAN 2.3 (Lynnon-Biosoft).

Si è proceduto alla correzione nel caso in cui l'elettroferogramma della sequenza fornito dall' *Eurofins* considerasse la coda di un picco precedente come se fosse una base, nel caso in cui non fosse stata considerata l'eterozigosità in alcuni nucleotidi, nel caso di sbagliato conteggio di una serie numerosa di basi uguali.

L'allineamento delle sequenze potrebbe rappresentare la maggior difficoltà nell'impiego dei dati di sequenza. Le sequenze sono state allineate mediante il programma ClustalW2, compreso nel pacchetto del software BioEdit 7.0 (Hall, 1990).

STEP 3

6.5.6 L'analisi dei dati di sequenza:

- Analisi dei parametri generali di polimorfismo;
 - La valutazione della percentuale della divergenza intraspecifica
 - Esame del potere discriminante a livello di specie
- c) Metodo Clustering
- d) Metodo Similarità

6.5.6.1 Analisi dei parametri generali di polimorfismo

Le sequenze prodotte sono state multiallineate attraverso il programma di multiallineamento ClustalW2, in gruppi separati per ciascun marcatore.

Ciascun multiallineamento è stato visualizzato con il software Seaview e, quando necessario, è stato modificato manualmente.

Successivamente, attraverso il software DNAsp 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) sono stati valutati alcuni parametri generali utili a descrivere il polimorfismo caratteristico di ogni marcatore e attraverso dei grafici di variabilità è stata visualizzata la distribuzione e l'andamento del polimorfismo lungo la sequenza nucleotidica.

I parametri scelti per la descrizione del polimorfismo sono:

S = numero di Siti polimorfici ossia il numero di siti in cui almeno due sequenze sono differenti.

Poiché S dipende (cioè è fortemente influenzato) sia dalla lunghezza della sequenza sia dal numero delle sequenze, è possibile applicare una correzione ed ottenere θ ;

θ = polimorfismo nucleotidico, cioè S diviso un fattore di correzione:

$$\theta = S/a1$$

$$a1 = \sum_{j=1}^{n-1} (1/j)$$

dove n rappresenta il numero di sequenze del campione.

Sia S che θ sono comunque ancora delle misure non perfette poiché non tengono conto della frequenza dei mutanti e per questo viene utilizzato anche il parametro π .

Π = diversità nucleotidica. Essa indica il numero medio di differenze nucleotidiche tra tutte le coppie.

$$\pi = \frac{\text{[numero totale di differenze / numero possibile di coppie]}}{\text{Lunghezza della sequenza}}$$

Infine abbiamo i PIC, i siti informativi secondo il criterio della Massima Parsimonia e quindi utilizzati per la costruzione degli alberi che seguono questo criterio.

PIC = siti che presentano un nucleotide differente in almeno due sequenze

Inoltre sempre per ciascun marcatore, è stata calcolata la percentuale di divergenza intraspecifica ed interspecifica. Questa valutazione è stata condotta utilizzando il modello di Kimura – 2 parametri. La denominazione Kimura 2P sta ad indicare che il modello evolutivo prevede due diverse velocità per *transizioni* e *transversioni* che vengono indicate con due diversi parametri (α e β).

6.5.6.2 La valutazione dell'efficienza dei marcatori nell'identificazione a livello di specie

La strategia più adatta per la valutazione dell'efficacia di un marcatore nell'identificazione della sequenza *query* ignota, non è stata ancora ben definita. In linea generale qualunque differenza in grado di distinguere due sequenze potrebbe consentire alla sequenza di DNA di lavorare come “barcode”; tuttavia non è stato ancora ottimizzato un algoritmo o un metodo che lavori esclusivamente nell'ambito delle sequenze del DNA Barcode, pertanto si utilizzano metodi creati per risolvere altre problematiche.

Per questo motivo il nostro dataset è stato valutato attraverso l'utilizzo di due metodi:

- 1- Algoritmi di clustering
- 2- Metodi di ricerca di similarità

Algoritmi di clustering

Questi metodi comprendono il Neighbour Joining, la Massima Parsimonia e il metodo della Massima Verosimiglianza (ML) e sono molto utilizzati. Attraverso di essi le sequenze vengono inizialmente multiallinate e successivamente vengono calcolate una o più topologie di relazione (dendrogrammi o alberi). Questo determina una clusterizzazione delle sequenze tra loro più vicine (ciò significa delle sequenze tra loro più simili) e la sequenza *query* si collocherà (o dovrebbe collocarsi) nel giusto cluster di appartenenza determinando la sua identità. Questi algoritmi sono usualmente utilizzati per la ricostruzione di filogenesi e questo conduce talvolta ad una confusione tra “alberi filogenetici” ed “alberi barcode”. Questi ultimi infatti non richiedono una dimostrazione di omologia che è al contrario necessaria per un marker filogenetico.

Inoltre, bassi livelli di divergenza che potrebbero essere non adeguati per una ricostruzione filogenetica, potrebbero invece essere sufficienti per poter effettuare una distinzione tra le specie.

L'uso di questi algoritmi può generare delle identificazioni ambigue che portano a disaccordo nella decisione di “successo” o “fallimento”; inoltre, variazioni nel multiallineamento, che può essere particolarmente problematico nel caso di sequenze non codificanti, potrebbero condurre ad identificazioni errate.

Metodi di ricerca di similarità

I metodi che utilizzano l'identificazione attraverso la ricerca di similarità (BLAST, MEGABLAST, BLAT) comparano la sequenza query ad un database di sequenze non allineate.

L'algoritmo calcola un punteggio, (Score) di similarità ed un valore di probabilità (E-value) tra le sequenze query e le sequenze presenti nel database, mostrando una lista dei migliori risultati.

Sebbene l'algoritmo BLAST sia stato usato in alcuni casi (Kress and Erikson, 2007) per l'identificazione delle sequenze nel contesto del DNA barcoding, i suoi vantaggi o svantaggi, in particolare rispetto agli altri algoritmi di clustering, non sono stati studiati in maniera completa.

Tuttavia è necessario precisare che l'enorme numero di sequenze che costituiranno il futuro database del DNA barcoding non consentiranno una identificazione attraverso gli algoritmi di clustering poiché i software e gli hardware attualmente disponibili non consentono la gestione di matrici, allineamenti e la produzione di alberi per un numero elevato di sequenze (>10.000).

Infatti il barcode of Life Database (BOLD) che contiene un numero parziale di sequenze barcode (principalmente COI) aggira i limiti computazionali utilizzando un sistema misto: la sequenza query seleziona attraverso un BLAST (metodo Ricerca di Similarità) le prime 100 proteine del gene COI con il miglior punteggio; queste vengono successivamente analizzate con un sistema di clustering che, attraverso la costruzione di un albero, determina l'identificazione della sequenza query.

•ESPERIMENTO Metodo di Clustering

In questo esperimento le sequenze multiallineate sono state convertite nel giusto formato per il software MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) attraverso il quale sono stati generati gli alberi Neighbour Joining per ciascun marcatore e poi per tutti i marcatori cloroplastici uniti.

Nella valutazione del potere discriminante del marcatore attraverso il metodo di Clustering, il successo viene attribuito quando la specie viene collocata nel gruppo delle corrispondenti specie monofiletiche ed è separata dalle altre specie con un adeguato supporto statistico (bootstrap almeno 50%) (Fazekas *et al.*, 2008; Lahaye *et al.*, 2008)

•ESPERIMENTO Metodo di Similarità

Attraverso il sito NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) [1] e attraverso l'icona "FTP site" si accede alla pagina da cui è possibile scaricare i programmi disponibili. Il programma BLAST è stato quindi scaricato ed installato sul nostro computer.

Il pacchetto scaricato contiene diversi programmi e di questi sono stati utilizzati "formatdb" "blastn". "formatdb" consente di creare un database proprio che può contenere sia sequenze scaricate da NCBI sia sequenze proprie. "blastn" consente di applicare l'algoritmo BLAST all'interno del database creato in precedenza.

Questo pacchetto, tuttavia non possiede un'interfaccia grafica (cioè menu a tendina) ma i comandi vengono dati attraverso la linea di comando ["command line"] a cui si accede dal ["prompt dei comandi"] in linguaggio DOS.

Attraverso l'uso di "formatdb" abbiamo creato un database chiamato "claudiadb" contenente 122 sequenze sia scaricate dal sito NCBI sia da noi prodotte e contro questo database abbiamo effettuato le 33 query, cioè una per ogni specie con i diversi marcatori; solo per la regione trnH-psbA sono state necessarie 9 query a causa del polimorfismo intraspecie di *Acer monspessulanum*.

7. RISULTATI DELLE ANALISI GENETICHE

7.1 Il polimorfismo di sequenza dei marcatori utilizzati nel genere *Acer*

In tabella n. 3 sono riportati i valori di polimorfismo di sequenza dei marcatori utilizzati nel genere *Acer*. Per ognuno di essi, oltre alla lunghezza del marcatore espressa in paia di basi,

Region	Length (bp)	S	PIC	π	θ
rbcl	638	7	5	0,0044±0,0005	0,00375±0,0019
rpoC1	517	5	2	0,00338±0,00076	0,00373±0,0022
trnH-psbA	508	20	11	0,0159±0,0020	0,01470±0,00650
ITS	622	95	53	0,06345±0,00630	0,05891±0,02582
Regioni Cloroplastiche Unite	1667	32	17	0,01006±0,00121	0,00947±0,00438

viene riportato con S il numero totale dei siti polimorfici, con PIC il numero dei siti informativi secondo il criterio della Massima Parsimonia; π esprime la diversità nucleotidica sottoforma del numero medio di differenze nucleotidiche a coppie. Infine con θ viene indicato il polimorfismo nucleotidico rispetto ad S.

Tabella 3. I valori del polimorfismo di sequenza dei marcatori utilizzati nel genere *Acer*

7.2 Rappresentazione grafica della variabilità nucleotidica.

Le rappresentazioni descrivono il livello di polimorfismo della sequenza, evidenziando quale parte della nostra sequenza risulta più variabile. Le rappresentazioni del polimorfismo nucleotidico degli spacer appaiono molto più irregolari.

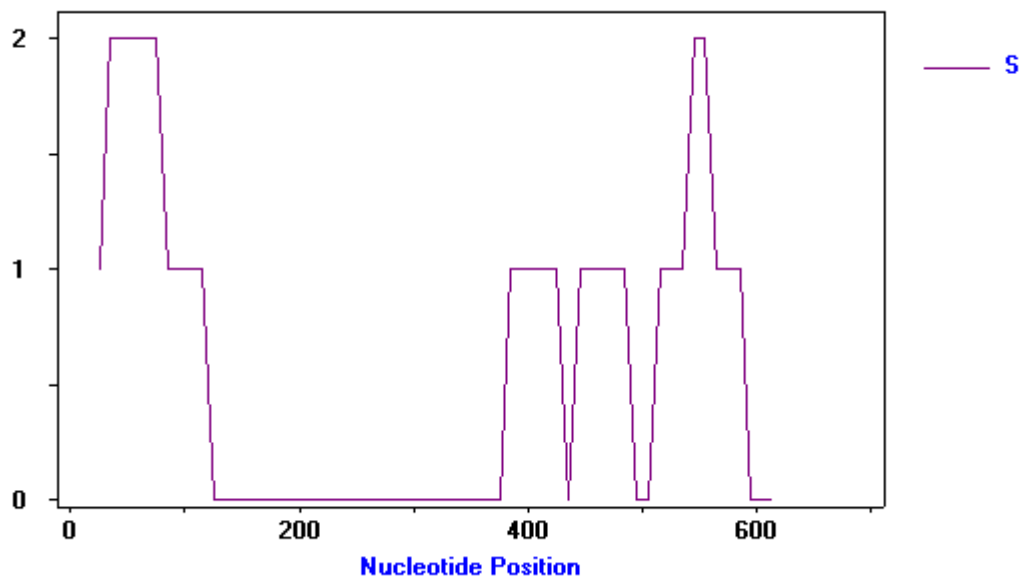


Grafico1

Polimorfismo nucleotidico rispetto a S (numero di siti polimorfici) del locus rbcL

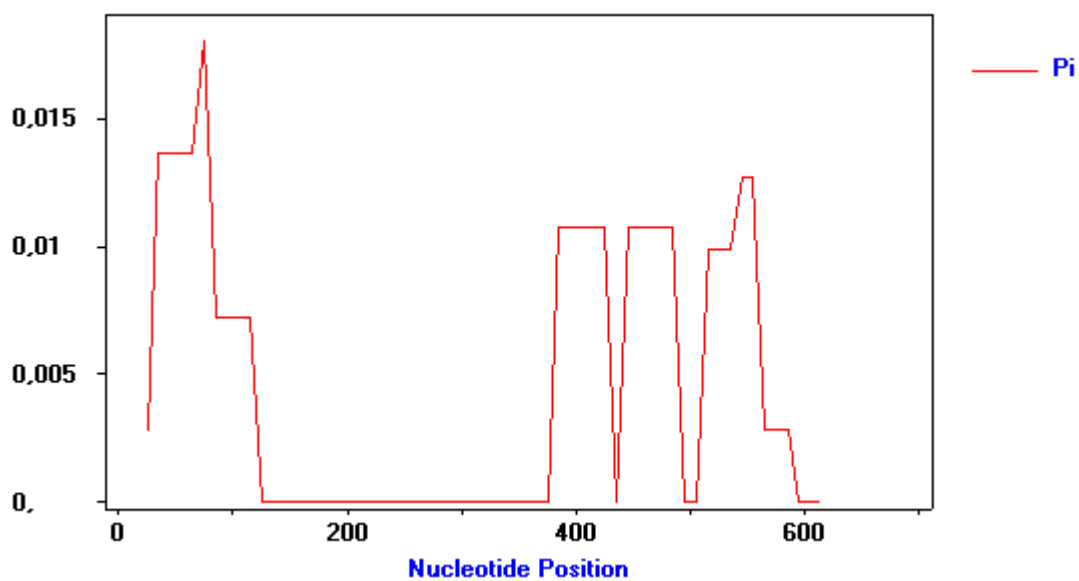


Grafico2

Polimorfismo nucleotidico rispetto a Pi greco (numero medio di differenze nucleotidiche a coppie per sito) del locus rbcL.

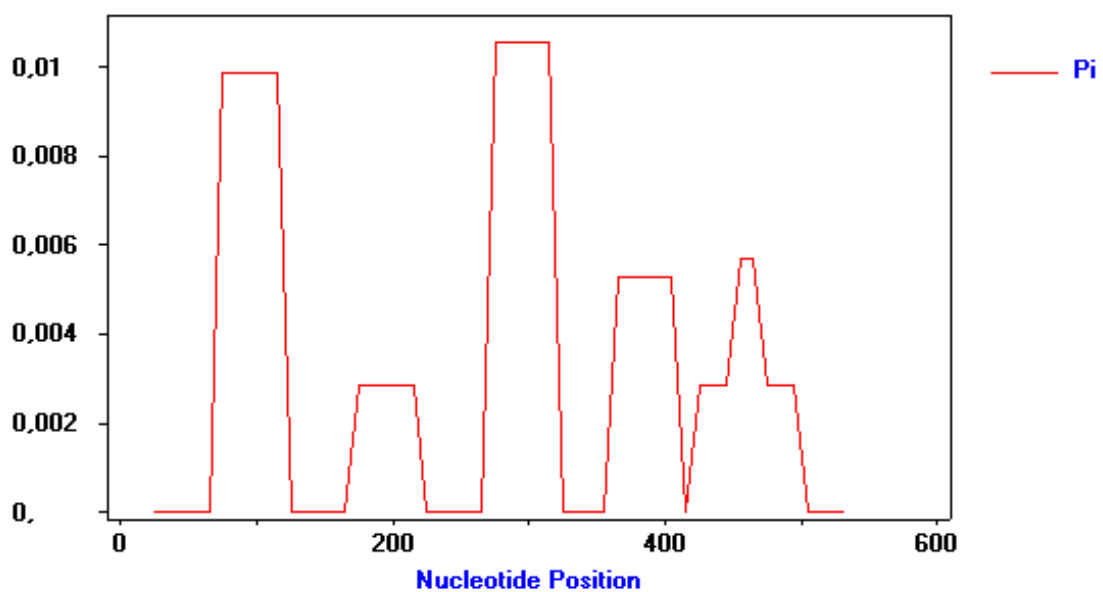


Grafico 3

Polimorfismo nucleotidico rispetto a Pi greco (numero medio di differenze nucleotidiche a coppie per sito) del locus rpoC.

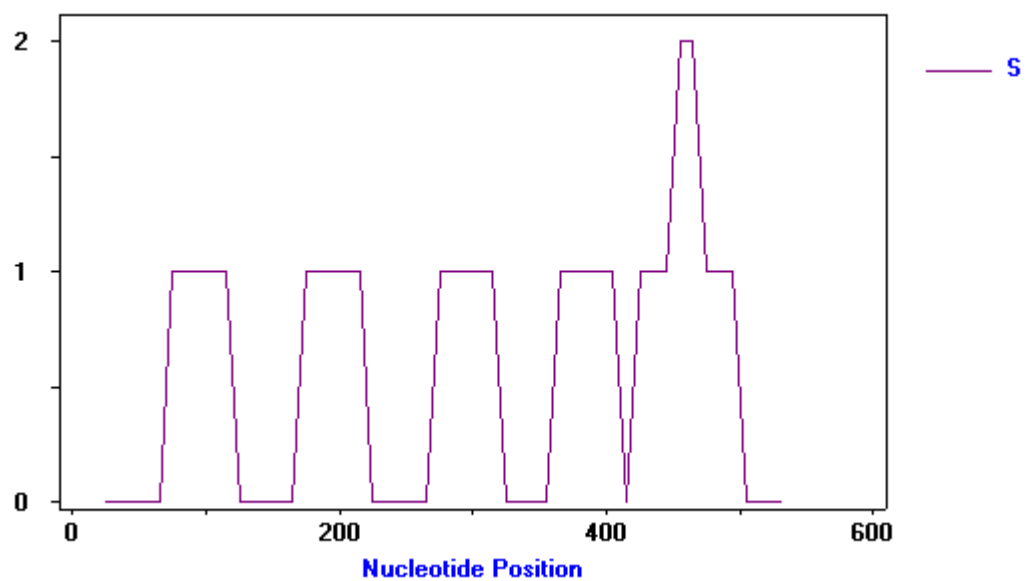


Grafico 4
polimorfismo nucleotidico rispetto a S (numero di siti polimorfici) del locus *rpoC*.

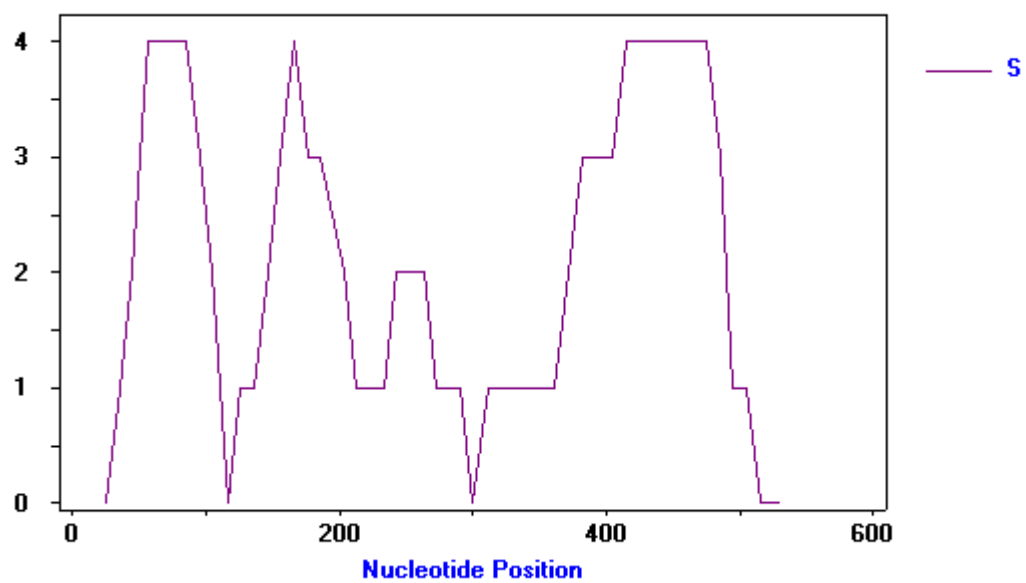


Grafico 5
polimorfismo nucleotidico rispetto a S (numero di siti polimorfici) del locus spacer.

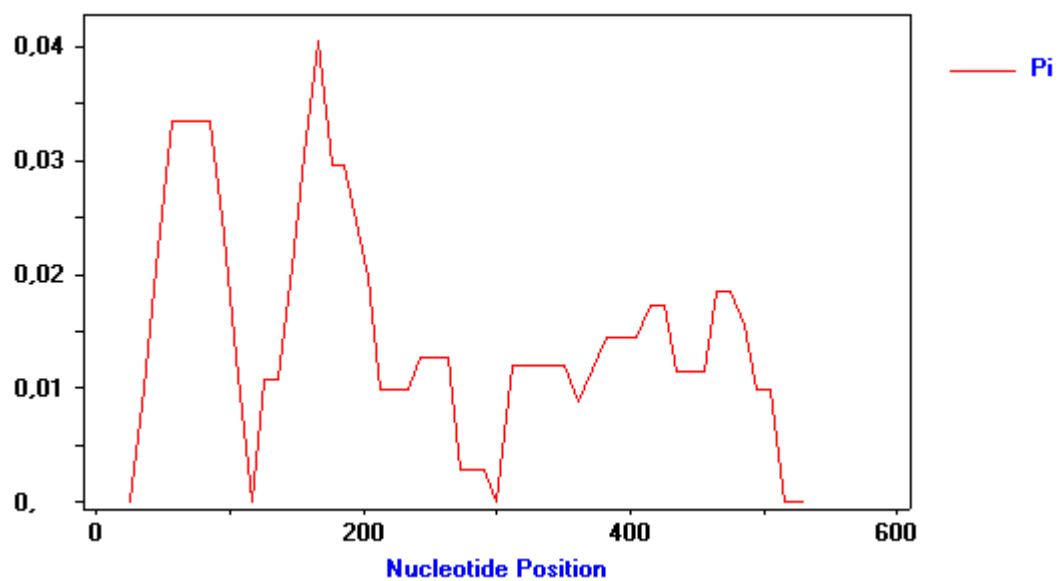


Grafico 6

Polimorfismo nucleotidico rispetto a Pi greco (numero medio di differenze nucleotidiche a coppie per sito) del locus spacer.

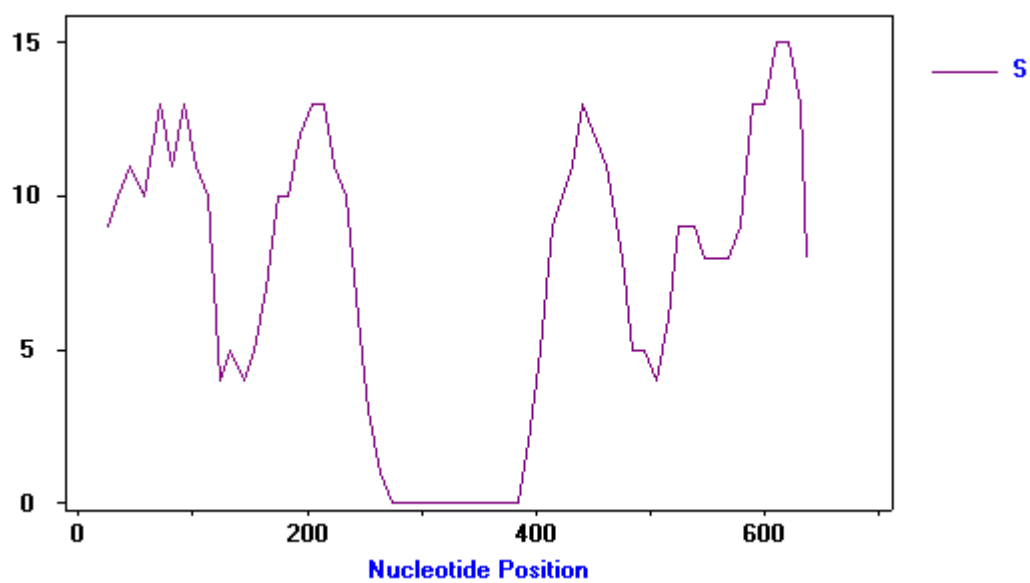


Grafico 7

Polimorfismo nucleotidico rispetto a S (numero di siti polimorfici) del locus ITS

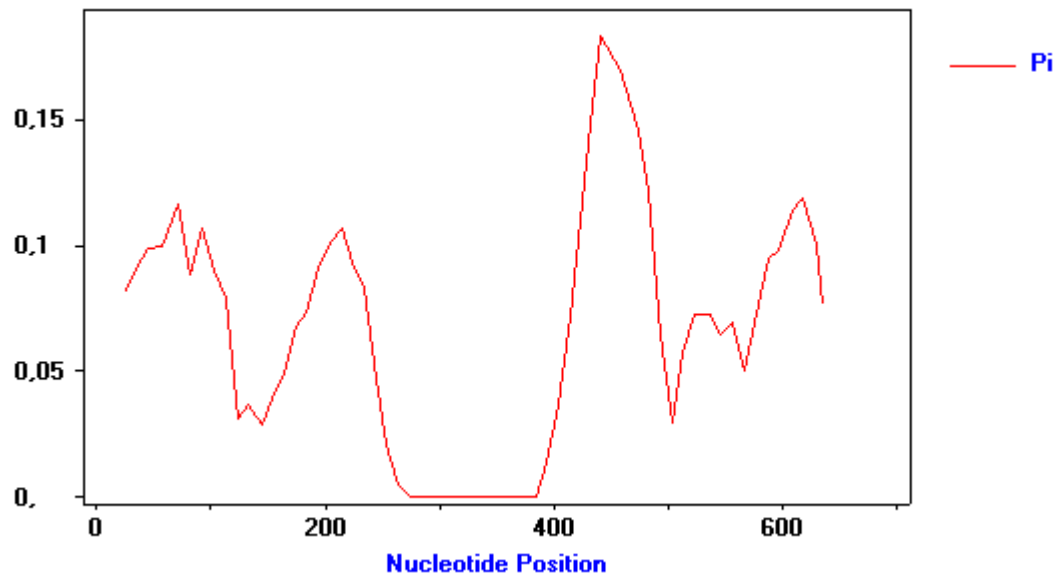


Grafico 8

Polimorfismo nucleotidico rispetto a Pi greco (numero medio di differenze nucleotidiche a coppie per sito) del locus ITS.

7.3 Tabelle della Divergenza interspecifica e intraspecifica dei quattro marcatori utilizzati (trnH-psbA, rbcL, rpoC1 e ITS).

Tab. 4 Regione cloroplastica trnH-psbA

Numero sequenze: 14
Numero specie: 8

Divergenza media **interspecifica** della regione cloroplastica trnH-psbA per le seguenti sequenze

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 12345	1.7439%
Acer campestre gi 12347	1.7439%
Acer campestre gi 2123555	1.7439%
Acer lobelii gi 12346	1.6586%
Acer monspessulanum gi 12349	1.0974%
Acer monspessulanum gi 212344	1.1999%
Acer negundo gi 1234	1.4903%
Acer obtusatum gi 123411	1.3264%
Acer obtusatum gi 2123410	1.3264%
Acer obtusatum gi 31234	1.3264%
Acer peronai gi 123413	1.1116%
Acer peronai gi 2123411	1.1116%
Acer platanoides gi 123414	1.4756%
Acer pseudoplatanus gi 123416	1.958%
Divergenza interspecifica media totale	1.48%

Tab. 5. Regione cloroplastica trnH-psbA

Divergenza media **intraspecifica** della regione cloroplastica trnH-psbA per le seguenti sequenze

Numero sequenze: 14

Numero specie: 8

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 12345	0.0%
Acer campestre gi 12347	0.0%
Acer campestre gi 2123555	0.0%
Acer lobelii gi 12346	No valid comparisons
Acer monspessulanum gi 12349	0.1916%

Acer monspessulanum gi 212344	0.1916%
Acer negundo gi 1234	No valid comparisons
Acer obtusatum gi 123411	0.0%
Acer obtusatum gi 2123410	0.0%
Acer obtusatum gi 31234	0.0%
Acer peronai gi 123413	0.0%
Acer peronai gi 2123411	0.0%
Acer platanoides gi 123414	No valid comparisons
Acer pseudoplatanus gi 123416	No valid comparisons

Tab. 6. Regione cloroplastica rbcL

Divergenza media **interspecifica** della regione cloroplastica rbcL per le seguenti sequenze

Numero sequenze: 14

Numero specie: 8

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 123434	0.6159%
Acer campestre gi 123436	0.6159%
Acer campestre gi 123435	0.6159%
Acer lobelii gi 123437	0.4236%
Acer monspessulanum gi 123423	0.407%
Acer monspessulanum gi 123422	0.407%
Acer negundo gi 1234	0.6664%
Acer obtusatum gi 123424	0.444%
Acer obtusatum gi 123425	0.444%
Acer obtusatum gi 123426	0.444%

Acer peronai gi 123427	0.407%
Acer peronai gi 123428	0.407%
Acer platanoides gi 123438	0.4236%
Acer psedoplatanus gi 123439	0.3749%
Percentuale di divergenza interspecifica media totale	0.47 %

Tab. 7. Regione cloroplastica rbcL

Divergenza media **intraspecifica** della regione cloroplastica rbcL per le seguenti sequenze

Numero sequenze: 14

Numero specie: 8

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 123434	0.0%
Acer campestre gi 123436	0.0%
Acer campestre gi 123435	0.0%
Acer lobelii gi 123437	No valid comparisons
Acer monspessulanum gi 123	0.0%
Acer monspessulanum gi 123422	0.0%
Acer negundo gi 1234	No valid comparisons
Acer obtusatum gi 123424	0.0%
Acer obtusatum gi 123425	0.0%

Acer obtusatum gi 123426	0.0%
Acer peronai gi 123427	0.0%
Acer peronai gi 123428	0.0%
Acer platanoides gi 123438	No valid comparisons
Acer psedoplatanus gi 123439	No valid comparisons
La variabilità intraspecie risulta zero in tutte le specie analizzate (0%)	

Tab. 8. Regione cloroplastica rpoC1

Divergenza media **interspecifica** della regione cloroplastica rpoC1 per le seguenti sequenze

Nome della sequenza	Divergenza media	Numero sequenze: 14 Numero specie: 8
Acer campestre gi 1234520	0.2962%	
Acer campestre gi 1234522	0.2962%	
Acer campestre gi 1234524	0.2962%	
Acer lobelii gi 12346	0.2506%	
Acer monspessulanum gi 12349	0.3019%	
Acer monspessulanum gi 123499	0.3019%	
Acer negundo gi 1234	0.4182%	
Acer obtusatum gi 31234	0.3293%	
Acer obtusatum gi 312343	0.3293%	
Acer obtusatum gi 312344	0.3293%	
Acer peronai gi 123413	0.3924%	
Acer peronai gi 2123411	0.3924%	
Acer platanoides gi 123414	0.2506%	
Acer pseudoplatanus gi 123416	0.5582%	
Divergenza interspecifica media totale	0.34%	

Tab. 9. Regione cloroplastica rpoC1

Divergenza media **intraspecifica** della regione cloroplastica rpoC1 per le seguenti sequenze

Numero sequenze: 14

Numero specie: 8

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 1234520	0.0%
Acer campestre gi 1234522	0.0%
Acer campestre gi 1234524	0.0%
Acer lobelii gi 12346	No valid comparisons
Acer monspessulanum gi 12349	0.0%
Acer monspessulanum gi 123499	0.0%
Acer negundo gi 1234	No valid comparisons
Acer obtusatum gi 31234	0.0%
Acer obtusatum gi 312343	0.0%

Acer obtusatum gi 312344	0.0%
Acer peronai gi 123413	0.0%
Acer peronai gi 2123411	0.0%
Acer platanoides gi 123414	No valid comparisons
Acer pseudoplatanus gi 123416	No valid comparisons

Tab. 10. Regione spaziatrice nucleare ITS

Divergenza media **interspecifica** della regione spaziatrice nucleare ITS per le seguenti sequenze

Numero sequenze: 8
Numero specie: 8

Nome della sequenza	Divergenza media
Acer campestre gi 123423	6.2901%
Acer lobellii gi 123425	6.3899%
Acer monspessulanum gi 123426	5.4299%
Acer negundo gi 123430	6.8225%
Acer obtusatum gi 123427	6.0681%
Acer peronai gi 123428	5.4299%
Acer platanoides gi 123424	6.5328%
Acer pseudoplatanus gi 123422	5.3668%
Divergenza interspecifica media total	6.04%

In Tabella n. 11 per ogni marcatore esaminato sono riportati i valori di lunghezza totale del Locus (bp); la lunghezza del frammento utilizzato (bp), la posizione in *Arabidopsis thaliana*, la percentuale di divergenza media intraspecifica (%), e la percentuale di divergenza media interspecifica (%).

Tab. 11

Regione	rbcL	rpoC1	trnH-psba	ITS
Lunghezza totale Locus bp	1440	2834		
Lunghezza frammento utilizzato bp	670	554	531	650
Posizione in Arabidopsis Thaliana	33-670	1822-2338		
Percentuale Divergenza media intrasp.	0	0	0.047**	N.D.
Percentuale divergenza Media intersp.	0.47%	0.34%	1.48%	6.04%

N.D. = Non Disponibile

** vedi discussione

7.4 Esperimento con il metodo di Similarità BLAST per ciascun marcatore. Output di ogni Query

Di seguito è riportata la prima pagina dell'output di ogni query relativa all'esperimento con il metodo di similarità BLAST per ciascun marcatore.

Il valore di Score rappresenta il punteggio relativo al grado di similarità tra la sequenza query e le sequenze presenti nel database.

E-value indica la probabilità che il match tra le due sequenze sia dovuto al caso (e quindi ad un errore) piuttosto che ad un reale grado di similarità. Come tutti i valori di probabilità ha un range tra 1 (evento sicuro) e 0 (evento impossibile) e nel nostro caso significa che la probabilità che quella coppia sia dovuta al caso è zero cioè impossibile.

Nel caso in cui due o più specie avessero sequenze uguali avrebbero lo stesso score e quindi non sarebbe possibile distinguerle.

ITS

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]algoritmo

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,

Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),

"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs",
Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= **Acernegundo ITS** (650 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E-Value:
Acernegundo ITS (match successo)	1289	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	1265	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	1249	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	1023	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	1001	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	973	0.0
gi 4176702 gb AF020369.1 AF020369 Acer micranthum 18S ribosomal ...	971	0.0
gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S ...	908	0.0

Apseudoplatanus ITS	898	0.0
gi 51537512 gb AY605454.1 Acer platanoides clone pl1203 18S rib...	890	0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess...	890	0.0
gi 86450943 gb DQ366128.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	890	0.0
gi 81302448 gb DQ238459.1 Acer platanoides clone pl-1406 18S ri...	888	0.0
gi 51537511 gb AY605453.1 Acer platanoides clone pl403 18S ribo...	886	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= **Aplatanoides ITS** (633 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E-Value:
Aplatanoides ITS	1255	0.0
gi 51537511 gb AY605453.1 Acer platanoides clone pl403 18S ribo...	1247	0.0
gi 51537515 gb AY605457.1 Acer platanoides clone pl1503 18S rib...	1247	0.0
gi 81302448 gb DQ238459.1 Acer platanoides clone pl-1406 18S ri...	1231	0.0
gi 51537512 gb AY605454.1 Acer platanoides clone pl1203 18S rib...	1231	0.0
gi 118026260 emb AM265508.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1066	0.0
Alobellii ITS	1061	0.0
gi 51537498 gb AY605440.1 Acer campestre clone ca1616 18S ribos...	1055	0.0
gi 118026261 emb AM265509.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1047	0.0

gi 118026239 emb AM265487.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1041	0.0
Acampestre ITS	1001	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	870	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	837	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	835	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	829	0.0
Acernegundo ITS	829	0.0
gi 4176702 gb AF020369.1 AF020369 Acer micranthum 18S ribosomal ...	819	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	795	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= **Aperonai ITS** (637 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	(bits)	E-Value:
Amonspessulanum ITS	1263		0.0
Aperonai ITS	1263		0.0
gi 86450941 gb DQ366126.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	1239		0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess...	1231		0.0
gi 86450943 gb DQ366128.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	1231		0.0
gi 157677353 emb AM238354.1 Acer ibericum 18S rRNA gene (partia...	1074		0.0
Apseudoplatanus ITS	985		0.0
gi 157677310 emb AM238311.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	965		0.0
Aobtusatum ITS	963		0.0

gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S ...	954	0.0
gi 157677318 emb AM238319.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	886	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	842	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	839	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	833	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	833	0.0
Acernegundo ITS	833	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	823	0.0
gi 118024915 emb AM113540.1 Acer saccharinum 18S rRNA gene (par...	815	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aobtusatum ITS (635 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Aobtusatum ITS	1259	0.0
gi 157677310 emb AM238311.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	1213	0.0
gi 157677318 emb AM238319.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	1132	0.0
Apseudoplatanus ITS	1043	0.0
gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S ...	1011	0.0
Amonspessulanum ITS	963	0.0
Aperonai ITS	963	0.0
gi 86450941 gb DQ366126.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	955	0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess..	948	0.0

gi 86450943 gb DQ366128.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	948	0.0
gi 157677353 emb AM238354.1 Acer ibericum 18S rRNA gene (partia...	892	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	829	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	825	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	817	0.0
Acernegundo ITS	817	0.0
gi 118024915 emb AM113540.1 Acer saccharinum 18S rRNA gene (par...	809	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	803	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	803	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Amonspessulanum ITS (637 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum ITS	1263	0.0
Aperonai ITS	1263	0.0
gi 86450941 gb DQ366126.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	1239	0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess...	1231	0.0
gi 86450943 gb DQ366128.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	1231	0.0
gi 157677353 emb AM238354.1 Acer ibericum 18S rRNA gene (partia...	1074	0.0
Apseudoplatanus ITS	985	0.0
gi 157677310 emb AM238311.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	965	0.0
Aobtusatum ITS	963	0.0

gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S ...	954	0.0
gi 157677318 emb AM238319.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	886	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	842	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	839	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	833	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	833	0.0
Acernegundo ITS	833	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	823	0.0
gi 118024915 emb AM113540.1 Acer saccharinum 18S rRNA gene (par...	815	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Alobellii ITS (631 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Alobellii ITS	1251	0.0
gi 81302448 gb DQ238459.1 Acer platanoides clone pl-1406 18S ri...	1072	0.0
gi 51537512 gb AY605454.1 Acer platanoides clone pl1203 18S rib..	1072	0.0
gi 51537511 gb AY605453.1 Acer platanoides clone pl403 18S ribo..	1068	0.0
gi 51537515 gb AY605457.1 Acer platanoides clone pl1503 18S rib...	1068	0.0
Aplatanoides ITS	1061	0.0
gi 118026260 emb AM265508.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti..	977	0.0
gi 118026239 emb AM265487.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	973	0.0
gi 51537498 gb AY605440.1 Acer campestre clone ca1616 18S ribos...	959	0.0

gi 118026261 emb AM265509.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	959	0.0
Acampestre ITS	934	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	866	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	821	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	813	0.0
Acernegundo ITS	813	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	809	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	807	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Acampestre ITS (641 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre ITS	1271	0.0
gi 118026261 emb AM265509.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1187	0.0
gi 118026239 emb AM265487.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1170	0.0
gi 51537498 gb AY605440.1 Acer campestre clone ca1616 18S ribos...	1150	0.0
gi 118026260 emb AM265508.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	1136	0.0
gi 81302448 gb DQ238459.1 Acer platanoides clone pl-1406 18S ri...	1013	0.0
gi 51537512 gb AY605454.1 Acer platanoides clone pl1203 18S rib...	1013	0.0
gi 51537511 gb AY605453.1 Acer platanoides clone pl403 18S ribo...	1009	0.0
gi 51537515 gb AY605457.1 Acer platanoides clone pl1503 18S rib...	1009	0.0

Aplatanoides ITS	1001	0.0
Alobellii ITS	934	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	775	0.0
Apseudoplatanus ITS	775	0.0
Acernegundo ITS	775	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	767	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	759	0.0
gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S ...	751	0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess...	747	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Apseudoplatanus ITS (635 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E(bits)Value
Apseudoplatanus ITS	1259	0.0
gi 86450948 gb DQ366133.1 Acer pseudoplatanus clone pp2517 18S .	1227	0.0
gi 157677310 emb AM238311.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA .	1043	0.0
Aobtusatum ITS	1043	0.0
gi 157677368 emb AM238369.1 Acer monspessulanum subsp. monspess..	985	0.0
Amonspessulanum ITS	985	0.0
Aperonai ITS	985	0.0
gi 157677318 emb AM238319.1 Acer opalus subsp. opalus 18S rRNA ...	983	0.0
gi 86450941 gb DQ366126.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	977	0.0

gi 86450943 gb DQ366128.1 Acer monspessulanum subsp. monspessul...	969	0.0
gi 157677353 emb AM238354.1 Acer ibericum 18S rRNA gene (partia...	914	0.0
gi 51537466 gb AY605408.1 Acer negundo clone ne704 18S ribosoma...	906	0.0
gi 51537465 gb AY605407.1 Acer negundo clone ne203 18S ribosoma...	898	0.0
Acernegundo ITS	898	0.0
gi 86450956 gb DQ366141.1 Acer nipponicum clone np102 18S ribos...	874	0.0
gi 81302331 gb DQ238342.1 Acer glabrum clone gl-114 18S ribosom...	848	0.0
gi 51537490 gb AY605432.1 Acer caudatum subsp. multiserratum cl...	846	0.0
gi 118026260 emb AM265508.1 Acer campestre 18S rRNA gene (parti...	819	0.0

TrnH-psbA

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Anegundo_trnh (531 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits)	Value
Anegundo_trnh	1053	0.0	
gi 197944230 gb EU750427.1 Acer negundo voucher OAC:AP244 tRNA-...	948	0.0	
gi 197944232 gb EU750428.1 Acer negundo voucher OAC:RBG017 tRNA..	948	0.0	
Aperonai_2 Trnh	821	0.0	
Aperonai_Trnh	821	0.0	
Amonspessulanum_2 trnh	813	0.0	
Amonspessulanum_Trnh	799	0.0	
Aobtusatum_3 trnh	799	0.0	

Aobtusatum_2 trnh	799	0.0
Aobtusatum_trnh	799	0.0
Apseudoplatanus_trnh	791	0.0
Acampestre_3trnh	724	0.0
Acampestre_2 trnh	724	0.0
Acampestre_trnh	724	0.0
Alobelii_Trnh	716	0.0
Aplatanoides_trnh	712	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	684	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Apseudoplatanus_trnh (519 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Apseudoplatanus_trnh	1029	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	906	0.0
Amonspessulanum_Trnh	902	0.0
Aobtusatum_3 trnh	902	0.0
Aobtusatum_2 trnh	902	0.0
Aobtusatum_trnh	902	0.0
Aperonai_2 Trnh	902	0.0
Aperonai_Trnh	902	0.0
Acampestre_3trnh	795	0.0

Acampestre_2 trnh	795	0.0
Acampestre_trnh	795	0.0
Anegundo_trnh	791	0.0
Aplatanoides_trnh	787	0.0
Alobelii_Trnh	771	0.0
gi 197944242 gb EU750433.1 Acer rubrum voucher OAC:JAG327 tRNA-...	767	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	767	0.0
gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	767	0.0
gi 197944256 gb EU750440.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 tR...	767	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aplatanoides_trnh (526 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Aplatanoides_trnh	1043	0.0
Acampestre_3trnh	1021	0.0
Acampestre_2 trnh	1021	0.0
Acampestre_trnh	1021	0.0
Alobelii_Trnh	1017	0.0
gi 197944236 gb EU750430.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 ...	888	0.0
gi 197944234 gb EU750429.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 t...	850	0.0
Aperonai_2 Trnh	811	0.0
Aperonai_Trnh	811	0.0

Amonspessulanum_2 trnh	805	0.0
Amonspessulanum_Trnh	791	0.0
Aobtusatum_3 trnh	791	0.0
Aobtusatum_2 trnh	791	0.0
Aobtusatum_trnh	791	0.0
Apseudoplatanus_trnh	787	0.0
Anegundo_trnh	712	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	666	0.0
gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	666	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aperonai_Trnh (525 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits)Value
Aperonai_2 Trnh	1041	0.0
Aperonai_Trnh	1041	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	1025	0.0
Amonspessulanum_Trnh	1011	0.0
Aobtusatum_3 trnh	1011	0.0
Aobtusatum_2 trnh	1011	0.0
Aobtusatum_trnh	1011	0.0
Apseudoplatanus_trnh	902	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	886	0.0

gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	886	0.0
gi 197944256 gb EU750440.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 tR...	886	0.0
Anegundo_trnh	821	0.0
Acampestre_3trnh	819	0.0
Acampestre_2 trnh	819	0.0
Acampestre_trnh	819	0.0
Aplatanoides_trnh	811	0.0
Alobelii_Trnh	795	0.0
gi 197944238 gb EU750431.1 Acer rubrum voucher OAC:JAG185 tRNA-...	775	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aobtusatum_trnh (523 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits)Value
Amonspessulanum_Trnh	1037	0.0
Aobtusatum_3 trnh	1037	0.0
Aobtusatum_2 trnh	1037	0.0
Aobtusatum_trnh	1037	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	1015	0.0
Aperonai_2 Trnh	1011	0.0
Aperonai_Trnh	1011	0.0
Apseudoplatanus_trnh	902	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	876	0.0

gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	876	0.0
gi 197944256 gb EU750440.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 tR...	876	0.0
Acampestre_3trnh	799	0.0
Acampestre_2 trnh	799	0.0
Acampestre_trnh	799	0.0
Anegundo_trnh	799	0.0
Aplatanooides_trnh	791	0.0
Alobelii_Trnh	775	0.0
gi 197944242 gb EU750433.1 Acer rubrum voucher OAC:JAG327 tRNA-...	771	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Amonspessulanum_Trnh (523 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits)Value
Amonspessulanum_Trnh	1037	0.0
Aobtusatum_3 trnh	1037	0.0
Aobtusatum_2 trnh	1037	0.0
Aobtusatum_trnh	1037	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	1015	0.0
Aperonai_2 Trnh	1011	0.0
Aperonai_Trnh	1011	0.0
Apseudoplatanus_trnh	902	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN..	876	0.0

gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	876	0.0
gi 197944256 gb EU750440.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 tR...	876	0.0
Acampestre_3trnh	799	0.0
Acampestre_2 trnh	799	0.0
Acampestre_trnh	799	0.0
Anegundo_trnh	799	0.0
Aplatanooides_trnh	791	0.0
Alobelii_Trnh	775	0.0
gi 197944242 gb EU750433.1 Acer rubrum voucher OAC:JAG327 tRNA-...	771	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Amonspessulanum_2 trnh (524 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum_2 trnh	1039	0.0
Aperonai_2 Trnh	1025	0.0
Aperonai_Trnh	1025	0.0
Amonspessulanum_Trnh	1015	0.0
Aobtusatum_3 trnh	1015	0.0
Aobtusatum_2 trnh	1015	0.0
Aobtusatum_trnh	1015	0.0

Apseudoplatanus_trnh	906	
0.0		
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN..	900	0.0
gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	900	0.0
gi 197944256 gb EU750440.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 tR...	900	0.0
Acampestre_3trnh	813	0.0
Acampestre_2 trnh	813	0.0
Acampestre_trnh	813	0.0
Anegundo_trnh	813	0.0
Aplatanoides_trnh	805	0.0
Alobelii_Trnh	789	0.0
gi 197944244 gb EU750434.1 Acer saccharinum voucher OAC:AP387 t...	773	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Alobelii_Trnh (528 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Alobelii_Trnh	1047	0.0
Aplatanoides_trnh	1017	0.0
Acampestre_3trnh	1005	0.0
Acampestre_2 trnh	1005	0.0
Acampestre_trnh	1005	0.0
gi 197944236 gb EU750430.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 ...	862	0.0

gi 197944234 gb EU750429.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 t...	835	0.0
Aperonai_2 Trnh	795	0.0
Aperonai_Trnh	795	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	789	0.0
Amonspessulanum_Trnh	775	0.0
Aobtusatum_3 trnh	775	
0.0		
Aobtusatum_2 trnh	775	
0.0		
Aobtusatum_trnh	775	0.0
Apseudoplatanus_trnh	771	0.0
Anegundo_trnh	716	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN...	650	0.0
gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR..	650	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Acampestre_trnh (524 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre_3trnh	1039	0.0
Acampestre_2 trnh	1039	0.0
Acampestre_trnh	1039	0.0
Aplatanoides_trnh	1021	0.0

Alobelii_Trnh	1005	0.0
gi 197944236 gb EU750430.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 ...	866	0.0
gi 197944234 gb EU750429.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 t...	848	0.0
Aperonai_2 Trnh	819	0.0
Aperonai_Trnh	819	0.0
Amonspessulanum_2 trnh	813	0.0
Amonspessulanum_Trnh	799	0.0
Aobtusatum_3 trnh	799	0.0
Aobtusatum_2 trnh	799	0.0
Aobtusatum_trnh	799	0.0
Apseudoplatanus_trnh	795	0.0
Anegundo_trnh	724	0.0
gi 197944252 gb EU750438.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 tRN..	674	0.0
gi 197944254 gb EU750439.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 tR...	674	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Anegundo_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Anegundo_rbcl	1328	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1312	0.0
Alobelii_rbcl	1304	0.0
Aplatanoides_rbcl	1304	0.0

Acampestre_3rbcl	1296	0.0
Acampestre_2 rbcl	1296	0.0
Acampestre_rbcl	1296	0.0
Amonspessulanum_2 rbcl	1289	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_rbcia	1289	0.0
Aperonai_2 rbcl	1289	0.0
Aperonai_rbcl	1289	0.0
gi 118723693 gb DQ978417.1 Acer negundo ribulose-1,5-bisphospat...	1217	0.0
gi 188037484 gb EU676887.1 Acer negundo voucher RBG017 (OAC) ri...	1215	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1209	0.0
gi 118723709 gb DQ978425.1 Acer pseudoplatanus ribulose-1,5-bis...	1209	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Apsedoplatanus_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Apsedoplatanus_rbcl	1328	0.0
Alobelii_rbcl	1320	0.0
Aplatanoides_rbcl	1320	0.0
Acampestre_3rbcl	1312	0.0

Acampestre_2 rbcl	1312	0.0
Acampestre_rbcl	1312	0.0
Anegundo_rbcl	1312	0.0
Amonspessulanum_2 rbcl	1304	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1304	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1304	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1304	0.0
Aobtusatum_rbc1a	1304	0.0
Aperonai_2 rbcl	1304	0.0
Aperonai_rbcl	1304	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat..	1225	0.0
gi 118723709 gb DQ978425.1 Acer pseudoplatanus ribulose-1,5-bis...	1225	0.0
gi 118723693 gb DQ978417.1 Acer negundo ribulose-1,5-bisphospat...	1217	0.0
gi 118723701 gb DQ978421.1 Acer palmatum ribulose-1,5-bisphospa...	1217	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aplatanoïdes_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Alobelii_rbcl	1328	0.0
Aplatanoïdes_rbcl	1328	0.0
Acampestre_3rbcl	1320	0.0
Acampestre_2 rbcl	1320	0.0

Acampestre_rbcl	1320	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1320	0.0
Anegundo_rbcl	1304	0.0
Amonspessulanum_2 rbcl	1296	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_rbcla	1296	0.0
Aperonai_2 rbcl	1296	0.0
Aperonai_rbcl	1296	0.0
gi 188037488 gb EU676889.1 Acer platanoides voucher JAG346 (OAC...1223		0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat... 1217		0.0
gi 118723709 gb DQ978425.1 Acer pseudoplatanus ribulose-1,5-bis... 1217		0.0
gi 118723693 gb DQ978417.1 Acer negundo ribulose-1,5-bisphospat... 1209		0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aperonai_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum_2 rbcl	1328	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1328	0.0

Aobtusatum_rbcla	1328	0.0
Aperonai_2 rbcl	1328	0.0
Aperonai_rbcl	1328	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1304	0.0
Alobelii_rbcl	1296	0.0
Aplatanoides_rbcl	1296	0.0
Acampestre_3rbcl	1289	0.0
Acampestre_2 rbcl	1289	0.0
Acampestre_rbcl	1289	0.0
Anegundo_rbcl	1289	0.0
gi 118723699 gb DQ978420.1 Acer opalus ribulose-1,5-bisphospate...	1225	0.0
gi 188037506 gb EU676898.1 Acer saccharum voucher JAG202 (OAC) .	1215	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1201	0.0
gi 118723701 gb DQ978421.1 Acer palmatum ribulose-1,5-bisphospa...	1201	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aobtusatum_rbcla (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum_2 rbcl	1328	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1328	0.0

Aobtusatum_rbcla	1328	0.0
Aperonai_2 rbcl	1328	0.0
Aperonai_rbcl	1328	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1304	0.0
Alobelii_rbcl	1296	0.0
Aplatanoides_rbcl	1296	0.0
Acampestre_3rbcl	1289	0.0
Acampestre_2 rbcl	1289	0.0
Acampestre_rbcl	1289	0.0
Anegundo_rbcl	1289	0.0
gi 118723699 gb DQ978420.1 Acer opalus ribulose-1,5-bisphospate...	1225	0.0
gi 188037506 gb EU676898.1 Acer saccharum voucher JAG202 (OAC) ...	1215	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1201	0.0
gi 118723701 gb DQ978421.1 Acer palmatum ribulose-1,5-bisphospa...	1201	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Amonspessulanum_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum_2 rbcl	1328	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1328	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1328	0.0

Aobtusatum_rbcla	1328	0.0
Aperonai_2 rbcl	1328	0.0
Aperonai_rbcl	1328	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1304	0.0
Alobelii_rbcl	1296	0.0
Aplatanoides_rbcl	1296	0.0
Acampestre_3rbcl	1289	0.0
Acampestre_2 rbcl	1289	0.0
Acampestre_rbcl	1289	0.0
Anegundo_rbcl	1289	0.0
gi 118723699 gb DQ978420.1 Acer opalus ribulose-1,5-bisphospate...	1225	0.0
gi 188037506 gb EU676898.1 Acer saccharum voucher JAG202 (OAC) ...	1215	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1201	0.0
gi 118723701 gb DQ978421.1 Acer palmatum ribulose-1,5-bisphospa...	1201	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Alobelii_rbclL (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Alobelii_rbcl	1328	0.0
Aplatanoides_rbcl	1328	0.0
Acampestre_3rbcl	1320	0.0
Acampestre_2 rbcl	1320	0.0

Acampestre_rbcl	1320	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1320	0.0
Anegundo_rbcl	1304	0.0
Amonspessulanum_2 rbcl	1296	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1296	0.0
Aobtusatum_rbc1a	1296	0.0
Aperonai_2 rbcl	1296	0.0
Aperonai_rbcl	1296	0.0
gi 188037488 gb EU676889.1 Acer platanoides voucher JAG346 (OA	1223	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1217	0.0
gi 118723709 gb DQ978425.1 Acer pseudoplatanus ribulose-1,5-bis...	1217	0.0
gi 118723693 gb DQ978417.1 Acer negundo ribulose-1,5-bisphospat...	1209	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Acampestre_rbcl (670 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre_3rbcl	1328	0.0
Acampestre_2 rbcl	1328	0.0
Acampestre_rbcl	1328	0.0
Alobelii_rbcl	1320	0.0

Aplatanoides_rbcl	1320	0.0
Apsedoplatanus_rbcl	1312	0.0
Anegundo_rbcl	1296	0.0
Amonspessulanum_2 rbcl	1289	0.0
Amonspessulanum_rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_2 rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_3 rbcl	1289	0.0
Aobtusatum_rbcla	1289	0.0
Aperonai_2 rbcl	1289	0.0
Aperonai_rbcl	1289	0.0
gi 188037488 gb EU676889.1 Acer platanoides voucher JAG346 (OAC..	1215	0.0
gi 118723679 gb DQ978410.1 Acer glabrum ribulose-1,5-bisphospat...	1209	0.0
gi 118723709 gb DQ978425.1 Acer pseudoplatanus ribulose-1,5-bis...	1209	0.0
gi 118723693 gb DQ978417.1 Acer negundo ribulose-1,5-bisphospat...	1201	0.0

RpoC

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Anegundo_rpo (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Anegundo_rpo	1098	0.0
Acampestre_3 rpoc	1090	0.0
Acampestre_2 rpoc	1090	0.0

Acampestre_rpoc	1090	0.0
Alobelii_rpoc	1090	0.0
Aplatanoides_rpoc	1090	0.0
Amonspessulanum_2 rpoc	1074	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_rpoc	1074	0.0
Aperonai_2 rpoc	1074	
0.0		
Aperonai_rpoc	1074	
0.0		
Apseudoplatanus_rpoc	1066	0.0
gi 197943754 gb EU750189.1 Acer negundo voucher OAC:AP244 RNA p. 872		0.0
gi 197943756 gb EU750190.1 Acer negundo voucher OAC:RBG017 RNA . 872		0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R... 864		0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aplatanoides_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre_3 rpoc	1098	0.0
Acampestre_2 rpoc	1098	0.0

Acampestre_rpoc	1098	0.0
Alobelii_rpoc	1098	0.0
Aplatanoides_rpoc	1098	0.0
Anegundo_rpo	1090	0.0
Amonspessulanum_2 rpoc	1082	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_rpoc	1082	0.0
Aperonai_2 rpoc	1082	
0.0		
Aperonai_rpoc	1082	
0.0		
Apseudoplatanus_rpoc	1074	0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R...	872	0.0
gi 197943760 gb EU750192.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 ...	872	0.0
gi 197943768 gb EU750196.1 Acer saccharinum voucher OAC:AP387 R...	872	0.0
gi 197943770 gb EU750197.1 Acer saccharinum voucher OAC:JAG324 ...	872	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Apseudoplatanus_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments: Score E (bits) Value

Apseudoplatanus_rpoc	1098	0.0
Acampestre_3 rpoc	1074	0.0
Acampestre_2 rpoc	1074	0.0
Acampestre_rpoc	1074	0.0
Alobelii_rpoc	1074	0.0
Amonspessulanum_2 rpoc	1074	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1074	0.0
Aobtusatum_rpoc	1074	0.0
Aperonai_2 rpoc	1074	
0.0		
Aperonai_rpoc	1074	
0.0		
Aplatanoides_rpoc	1074	0.0
Anegundo_rpo	1066	0.0
gi 197943776 gb EU750200.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 RNA..	856	0.0
gi 197943778 gb EU750201.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 RN...	856	0.0
gi 197943780 gb EU750202.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 RN...	856	0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R...	848	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aperonai_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Aperonai_2 rpoc	1098	0.0
Aperonai_rpoc	1098	0.0
Acampestre_3 rpoc	1082	0.0
Acampestre_2 rpoc	1082	0.0
Acampestre_rpoc	1082	0.0
Alobelii_rpoc	1082	0.0
Amonspessulanum_2 rpoc	1082	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_rpoc	1082	0.0
Aplatanoides_rpoc	1082	0.0
Apseudoplatanus_rpoc	1074	0.0
Anegundo_rpo	1074	0.0
gi 197943776 gb EU750200.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 RNA...864		0.0
gi 197943778 gb EU750201.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 RN.. 864		0.0
gi 197943780 gb EU750202.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 RN... 864		0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R... 856		0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Aobtusatum_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits)	Value
Amonspessulanum_2 rpoc	1098		0.0
Amonspessulanum_rpoc	1098		0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1098		0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1098		0.0
Aobtusatum_rpoc	1098		0.0
Acampestre_3 rpoc	1082		0.0
Acampestre_2 rpoc	1082		0.0
Acampestre_rpoc	1082		0.0
Alobelii_rpoc	1082		0.0
Aperonai_2 rpoc	1082		0.0
Aperonai_rpoc	1082		0.0
Aplatanoides_rpoc	1082		0.0
Apseudoplatanus_rpoc	1074		0.0
Anegundo_rpo	1074		0.0
gi 197943776 gb EU750200.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 RNA...	872		0.0
gi 197943778 gb EU750201.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 RN...	872		0.0
gi 197943780 gb EU750202.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 RN...	872		0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R...	864		0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,

Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),

"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Amonspessulanum_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Amonspessulanum_2 rpoc	1098	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1098	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1098	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1098	0.0
Aobtusatum_rpoc	1098	0.0
Acampestre_3 rpoc	1082	0.0
Acampestre_2 rpoc	1082	0.0
Acampestre_rpoc	1082	0.0
Alobelii_rpoc	1082	0.0
Aperonai_2 rpoc	1082	0.0
Aperonai_rpoc	1082	0.0
Aplatanoides_rpoc	1082	0.0
Apseudoplatanus_rpoc	1074	0.0
Anegundo_rpo	1074	0.0
gi 197943776 gb EU750200.1 Acer saccharum voucher OAC:AP268 RNA..872		0.0
gi 197943778 gb EU750201.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG202 RN...872		0.0
gi 197943780 gb EU750202.1 Acer saccharum voucher OAC:JAG251 RN. 872		0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R... 864		0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Alobelii_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre_3 rpoc	1098	0.0
Acampestre_2 rpoc	1098	0.0
Acampestre_rpoc	1098	0.0
Alobelii_rpoc	1098	0.0
Aplatanoides_rpoc	1098	0.0
Anegundo_rpo	1090	0.0
Amonspessulanum_2 rpoc	1082	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_rpoc	1082	0.0
Aperonai_2 rpoc	1082	0.0
Aperonai_rpoc	1082	0.0
Apseudoplatanus_rpoc	1074	0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R..	872	0.0
gi 197943760 gb EU750192.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 ...	872	0.0
gi 197943768 gb EU750196.1 Acer saccharinum voucher OAC:AP387 R...	872	0.0
gi 197943770 gb EU750197.1 Acer saccharinum voucher OAC:JAG324 ...	872	0.0

BLASTN 2.2.19 [Nov-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= Acampestre_rpoc (554 letters)

Database: claudiadb 122 sequences; 80,688 total letters

Searching.....done

Sequences producing significant alignments:	Score	E (bits) Value
Acampestre_3 rpoc	1098	0.0
Acampestre_2 rpoc	1098	0.0
Acampestre_rpoc	1098	0.0
Alobelii_rpoc	1098	0.0
Aplatanoides_rpoc	1098	0.0
Anegundo_rpo	1090	
0.0		
Amonspessulanum_2 rpoc	1082	0.0
Amonspessulanum_rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_3 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_2 rpoc	1082	0.0
Aobtusatum_rpoc	1082	0.0
Aperonai_2 rpoc	1082	
0.0		
Aperonai_rpoc	1082	
0.0		
Apseudoplatanus_rpoc	1074	0.0
gi 197943758 gb EU750191.1 Acer platanoides voucher OAC:AP367 R... 872		0.0
gi 197943760 gb EU750192.1 Acer platanoides voucher OAC:JAG346 .. 872		0.0
gi 197943768 gb EU750196.1 Acer saccharinum voucher OAC:AP387 R...872		0.0
gi 197943770 gb EU750197.1 Acer saccharinum voucher OAC:JAG324 .. 872		0.0

Tabella n. 12. Riepilogo specie discriminate con esperimento Metodi di similarità (BLASTn)

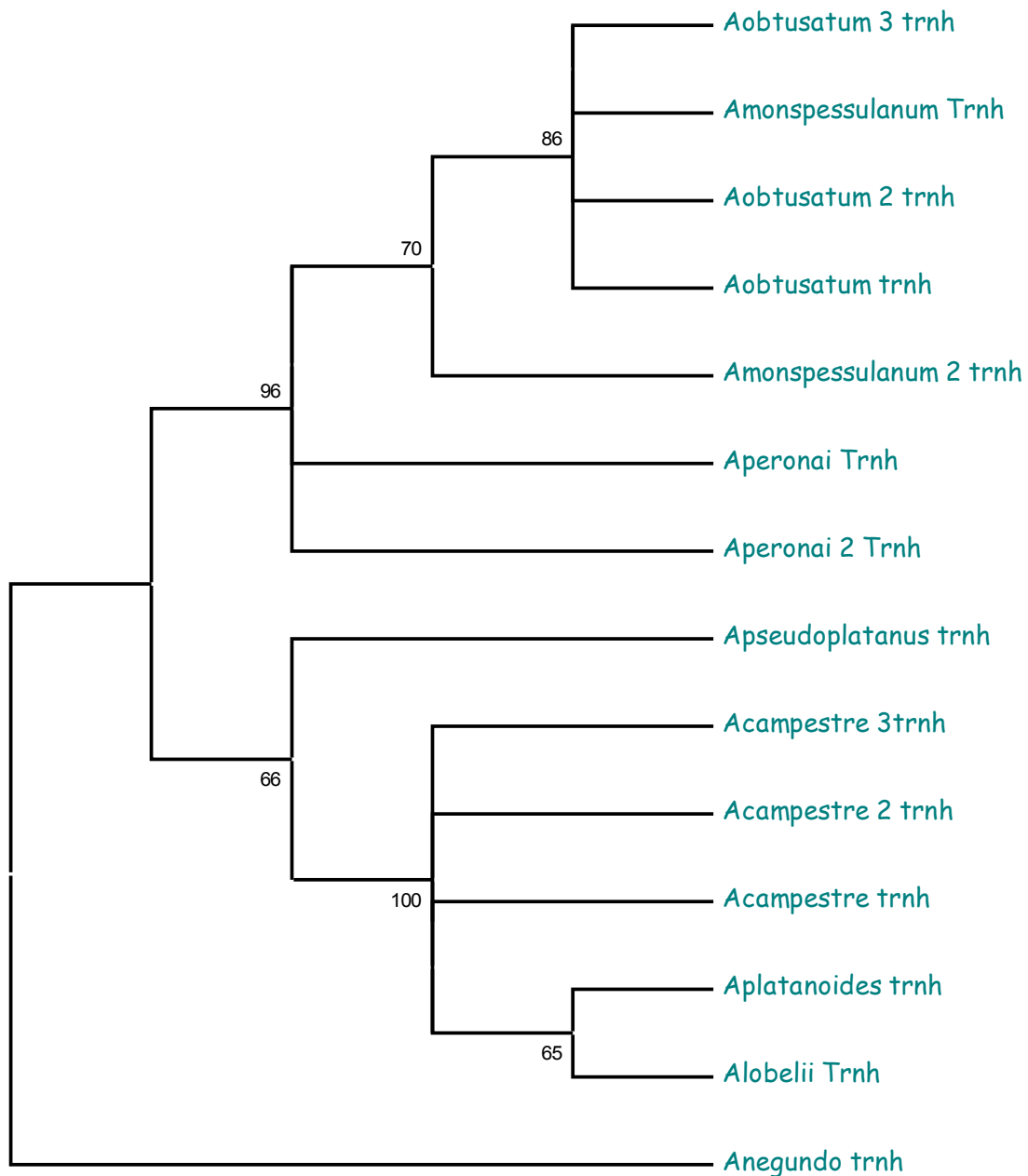
<i>MARCATORE</i>	<i>NUMERO QUERY</i>	<i>PERCENTUALE SUCCESSO</i>	<i>SPECIE DISCRIMINATE CON SUCCESSO</i>
<i>RBCL</i>	8	37.5%	3/8
<i>RPOCI</i>	8	37.5%	3/8
<i>TRNH-PSBA</i>	9	77.7%	6/8
<i>ITS</i>	8	75%	6/8

Tab 12. Sono riportati i valori del numero di Query, e i valori percentuali delle specie discriminate per ogni marcatore indagato.

7.5 Dendrogrammi ottenuti dall'esperimento Algoritmi Clustering

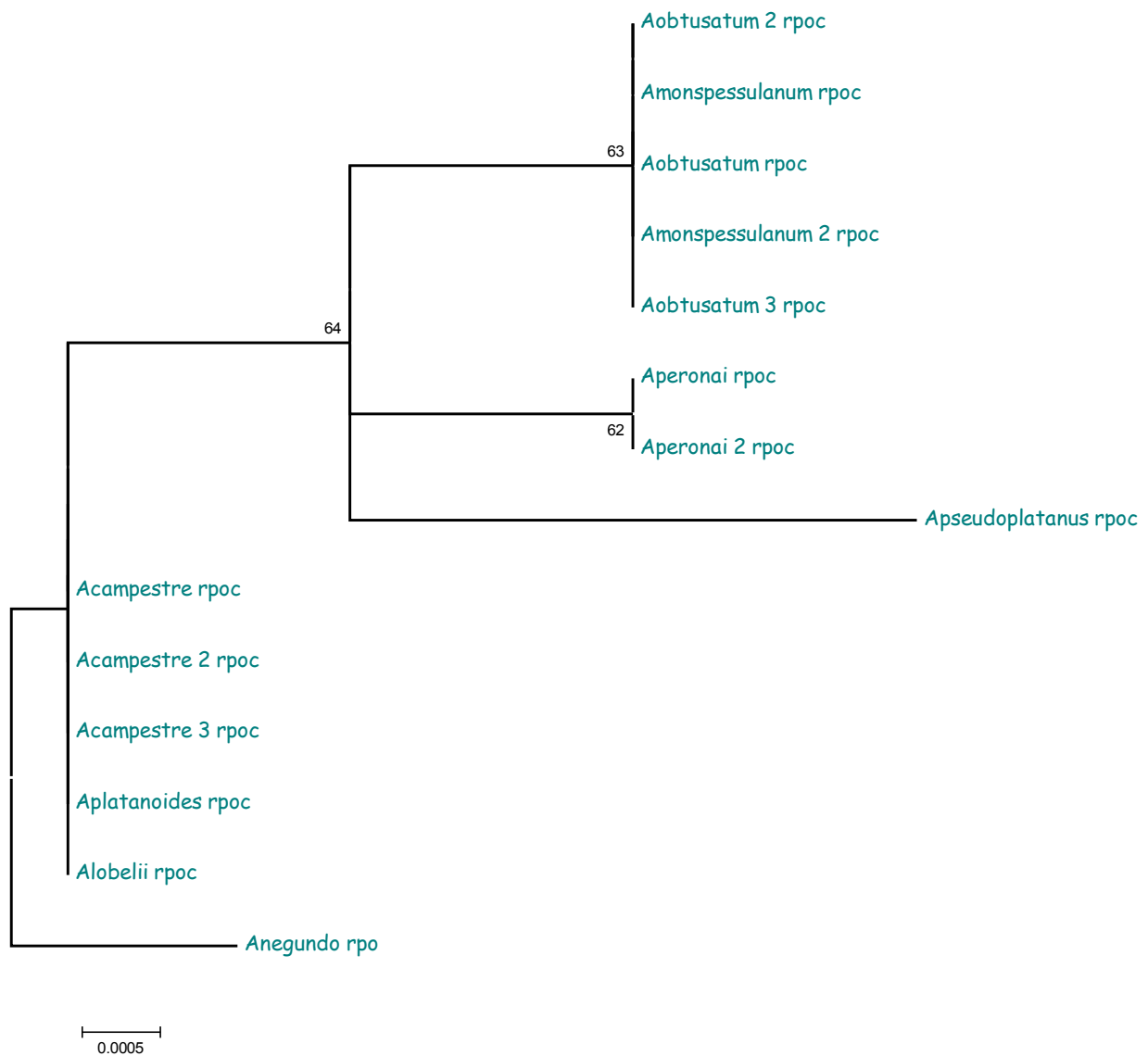
Dendrogramma n. 1

Esperimento clustering per le sequenze dello spaziatore cloroplastico trnH-psbA utilizzando l'algoritmo del Neighbor-Joining
 Il successo è di 6 specie su 8.



Dendrogramma n. 2

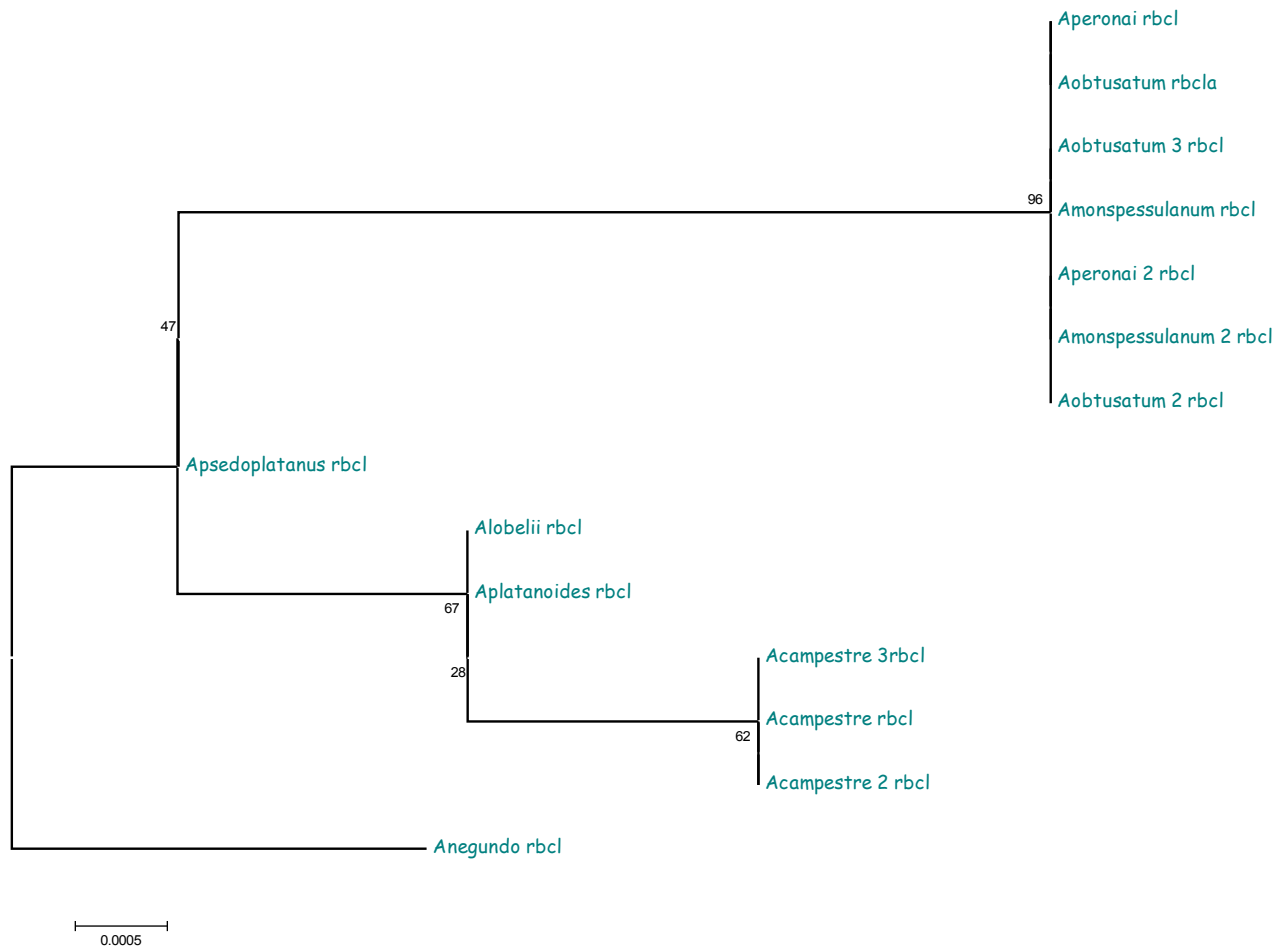
Esperimento clustering per le sequenze dello spaziatore cloroplastico rpoC1 utilizzando l'algoritmo del Neighbor-Joining.
 Il successo è di 3 specie su 8.



Dendrogramma n. 3

Esperimento clustering per le sequenze dello spaziatore cloroplastico rbcL utilizzando l'algoritmo del Neighbor-Joining.

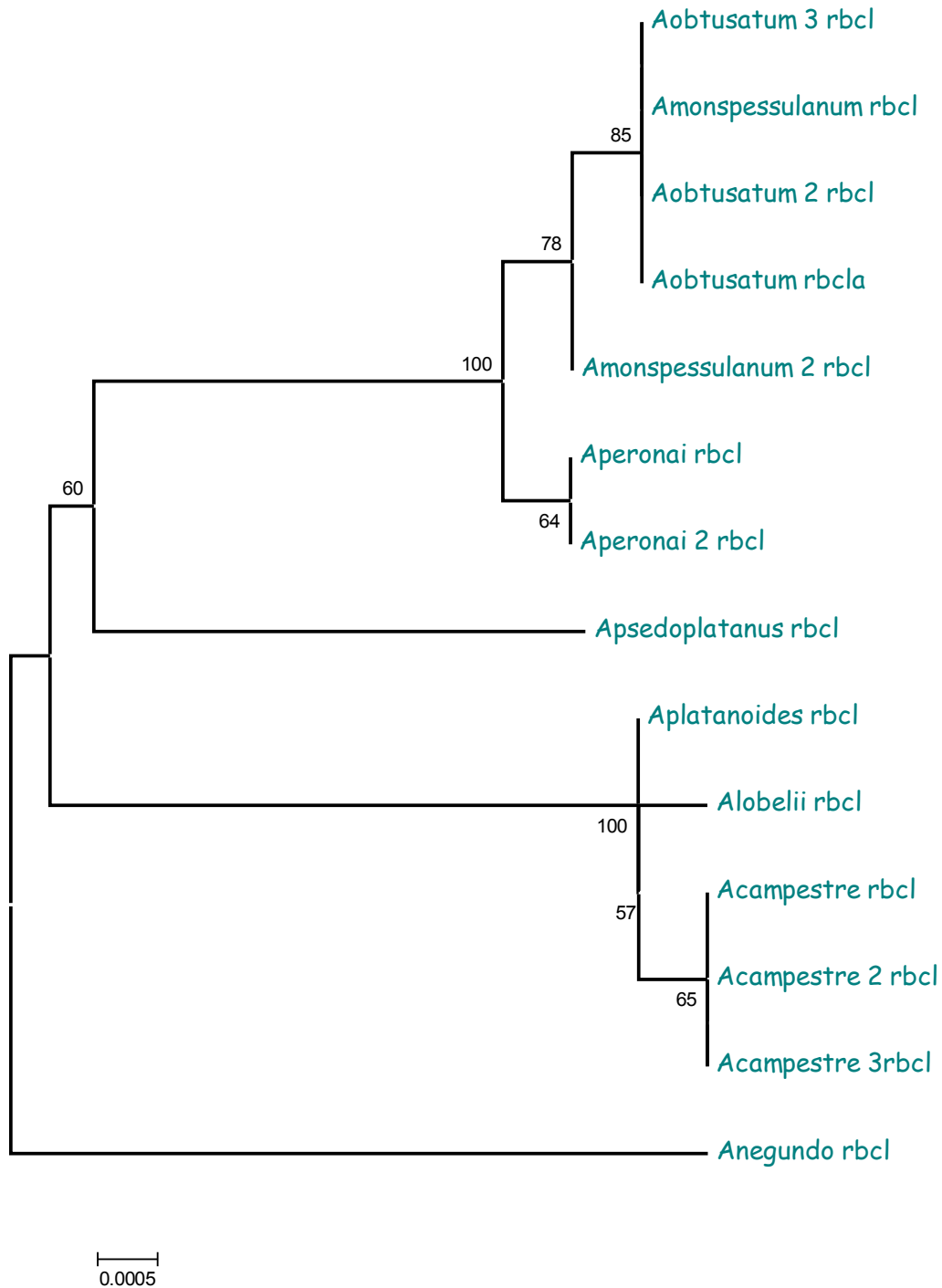
Il successo è di 3 specie su 8.



Dendrogramma n. 4

Eperimento clustering delle sequenze dei tre marcatori cloroplastici uniti, utilizzando l'algoritmo del Neighbor-Joining.

il successo è di 6 specie su 8.



Dendrogramma n. 5

Esperimento clustering per le sequenze dello spaziatore nucleare ITS utilizzando l'algoritmo del Neighbor-Joining.

Il successo è di 6 specie su 8.

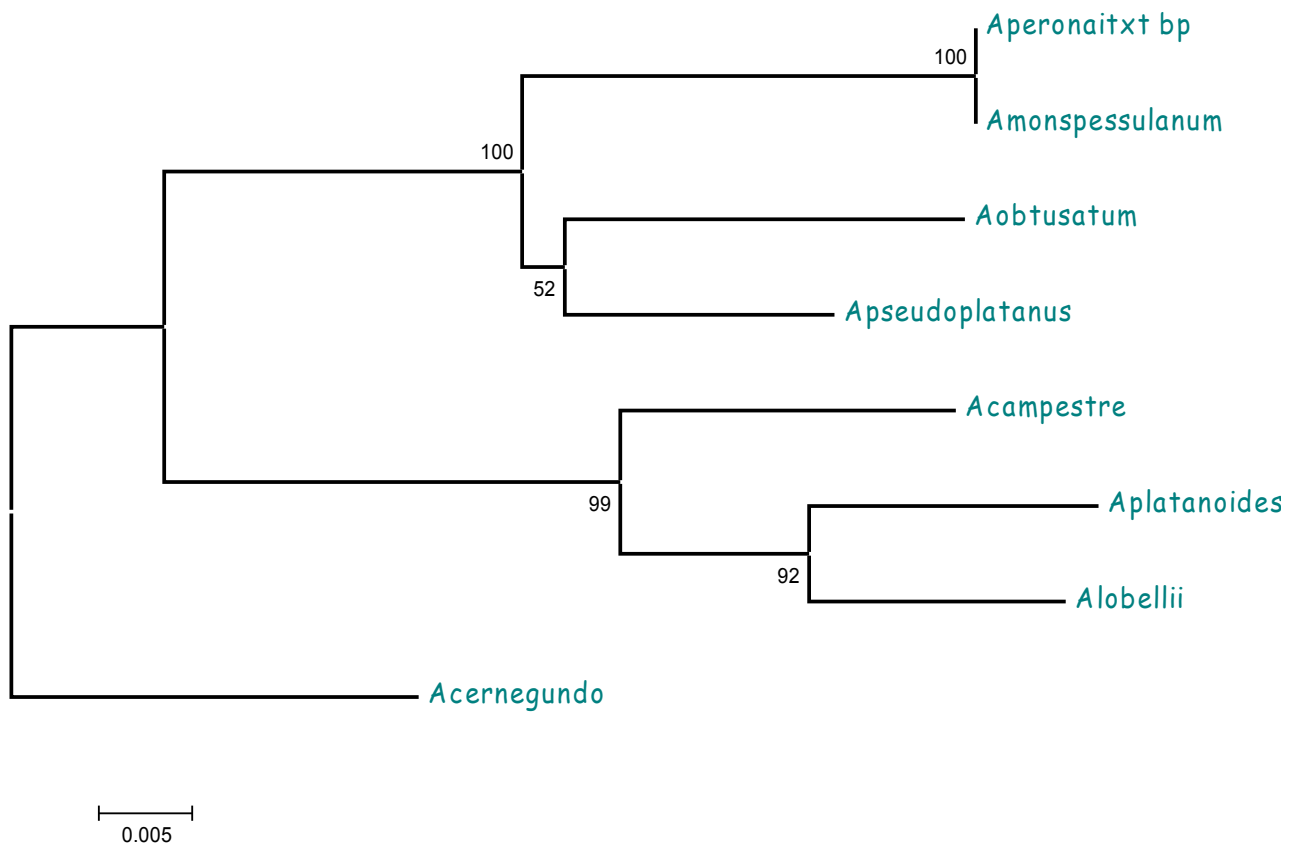


Tabella n. 13. Riepilogo specie discriminate con l'esperimento Algoritmi Clustering (NJ)

MARCATORE	Numero Specie	PERCENTUALE SUCCESSO	SPECIE DISCRIMINATE CON SUCCESSO
<i>RBCL</i>	8	37.5%	3/8
<i>RPOC1</i>	8	37.5%	3/8
<i>TRNH-PSBA</i>	8	75%	6/8
<i>Marcatori cloroplastici uniti</i>	8	75%	6/8
<i>ITS</i>	8	75%	6/8

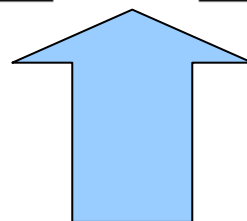
7.6 Multiallineamento della regione cloroplastica trnH-psbA.

Pretty plot of ./temp.prettyp.1.pasteseq1

Fri 30 Jan 2009 11:34:18

Aneunda-t	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aperanei-T	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aperanei-2	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Amenaspessu	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aabtuatum	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aabtuatum	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aabtuatum	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Amenaspessu	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Apseudopla	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aplataneid	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aoampetra	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aoampetra	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Aoampetra	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50
Albelli-T	CGCGCATGGTGGATTCACAATCCACTGCCTTGATCCAATTGGCTACATCC	50

Aneunda-t	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAAAAATAAAAA GATTG C AATTTCTACC	100
Aperanei-T	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Aperanei-2	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Amenaspessu	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Aabtuatum	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Aabtuatum	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Aabtuatum	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Amenaspessu	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAA GATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	99
Apseudopla	SCCCCCCACTAGCTACAAAAATTA CAAAAATAAAAA GATTGAAATTTCTACC	100
Aplataneid	SCCCCCC S C T A G ----- T A C A A A A T A A A A S G A T T G A A A T T T C T A C C	91
Aoampetra	SCCCCCC S C T A G ----- T A C A A A A T A A A A S G A T T G A A A T T T C T A C C	91
Aoampetra	SCCCCCC S C T A G ----- T A C A A A A T A A A A S G A T T G A A A T T T C T A C C	91
Aoampetra	SCCCCCC S C T A G ----- T A C A A A A T A A A A S G A T T G A A A T T T C T A C C	91
Albelli-T	SCCCCCC S C T A G ----- T A C A A A A T A A A A S G A T T G A A A T T T C T A C C	91



Delezione

-plurality 7.0 -collision -box -noboxcol -colbyconsensus -alt 1

Blocco 1

Pretty plot of ./temp·prettyp·1·pasteseq1

Fri 30 Jan 2009 11:34:18

Aneunda-t	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATGAAG	149
Aperanai-T	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aperanai-2	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Amonspessu	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aabtuatum	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aabtuatum	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Amonspessu	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Apsudapla	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aplatanoit	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aoampestre	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aoampestre	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aoampestre	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aobelii-T	ATTAATCATCTTTTCTTACCTTAATTATGAAGATACAAATTAAG	149
Aneunda-t	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aperanai-T	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aperanai-2	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Amonspessu	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aabtuatum	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aabtuatum	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Amonspessu	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Apsudapla	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aplatanoit	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aoampestre	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aoampestre	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aoampestre	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182
Aobelii-T	AGACAAAGAGGCATAAATTTCCAAACTTTTATATTATATAGAAATAGAA	182

Blocco 2

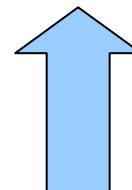
Pretty plot of ./temp·prettyp·1·pasteseq1

Fri 30 Jan 2009 11:34:18

Aneunda-t	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aperanai-T	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aperanai-2	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Amonspessu	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aabtuatum	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aabtuatum	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Amonspessu	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Apsudapla	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aplatanoit	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aoampestre	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aoampestre	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aoampestre	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aobelii-T	AAATTGACTCAAAATTAATAAACTGTAAAGTCATAATACTAAAGGCTAAT	242
Aneunda-t	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	285
Aperanai-T	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aperanai-2	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Amonspessu	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aabtuatum	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aabtuatum	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Amonspessu	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Apsudapla	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aplatanoit	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aoampestre	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aoampestre	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aoampestre	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282
Aobelii-T	TTAATTATTAGCAGTAGTAATAATATGATAC	282

Blocco 3

Inserzione



Fri 30 Jan 2009 11:34:18

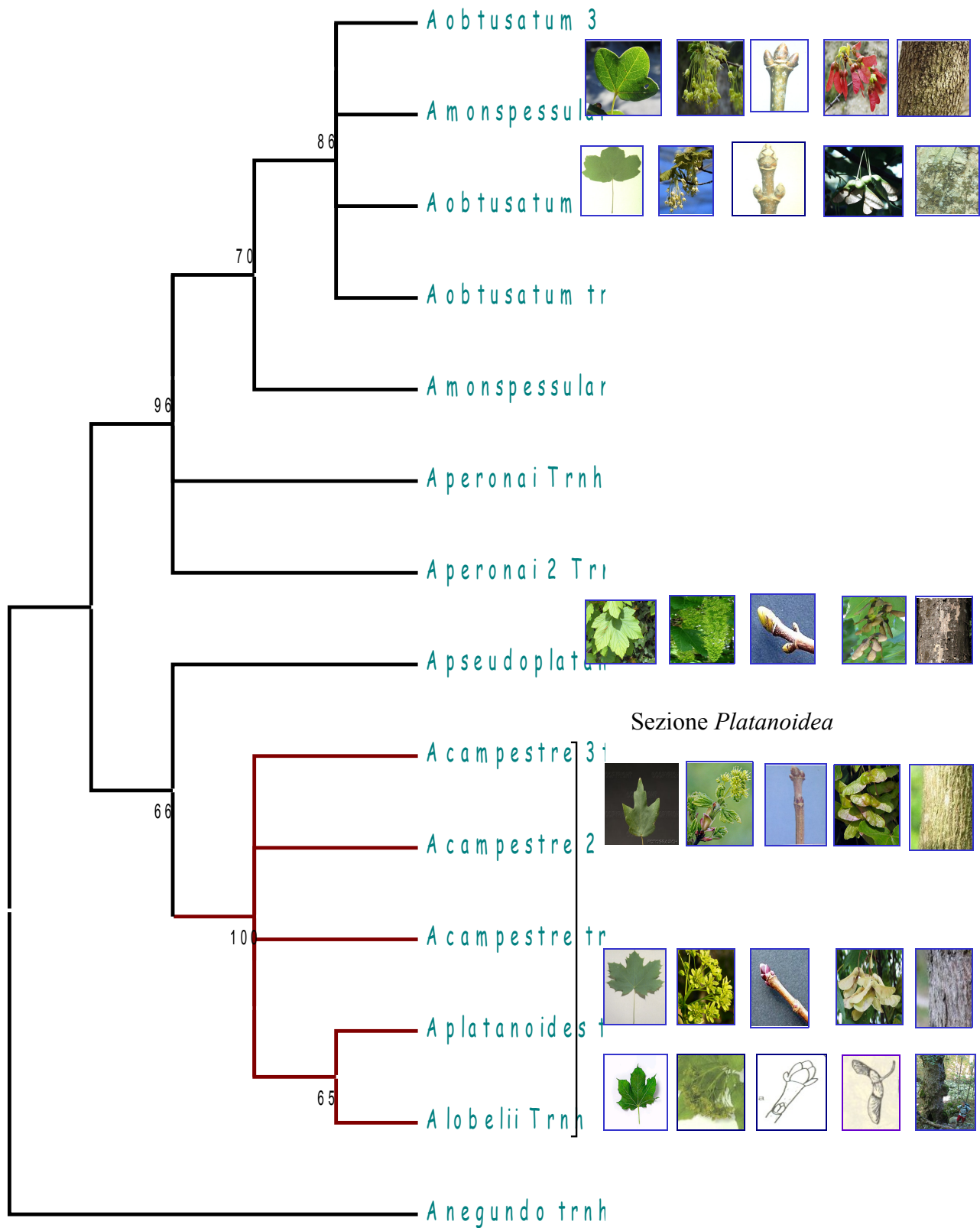
[illegible]

```
...y plot of ./temp.prettyp.1.pasteseq1
```

Blocco 5

7.7 Monofilia della Sezione *Platanoidea*

Dendrogramma n. 6



8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come già illustrato, la ricerca di una o più regioni che possano lavorare in maniera adeguata come DNA barcode per gli organismi vegetali, non è semplice.

Attraverso il nostro dataset, sebbene non molto esteso, sono stati analizzati e valutati i fattori fondamentali per la selezione delle regioni barcode:

- amplificazione con primers universali;
- range di diversità nucleotidica;
- potere discriminante a livello di specie;
- problematiche bioinformatiche di analisi.

La diversità nucleotidica è stata ampiamente esplorata con diversi approcci. Come atteso, le regioni codificanti *rbcL* e *rpoC1* mostrano un livello di polimorfismo e di divergenza molto bassi. La tabella n. 3 che riassume i valori di polimorfismo mostra, per entrambi i marcatori, dei valori di variabilità circa 4 volte più bassi della regione spaziatrice *trnH-psbA*. Questo quadro è ulteriormente confermato dall'analisi della divergenza, riportato in tabella n. 11 che è pari a 0 nella valutazione intraspecie e molto basso (minore di 0.5 %) anche effettuando un'analisi interspecie. Questo naturalmente pregiudica la loro capacità di discriminare a livello di specie che, in entrambi gli esperimenti (Clustering e Similarità) è circa del 35 %, quindi assolutamente insufficiente per poter essere giudicati positivamente come potenziale barcode.

Probabilmente essi rivelano il loro potenziale a livelli tassonomici più alti, mentre nel nostro dataset tutte le specie appartengono allo stesso genere.

La regione cloroplastica *trnH-psbA* non codificante e pertanto non soggetta a costrizioni funzionali, mostra una variabilità decisamente maggiore sia nei valori generali del polimorfismo che nello studio della divergenza. Anche l'osservazione dei grafici di variabilità ci mostra come questo polimorfismo sia non solo maggiore rispetto alle regioni codificanti, ma anche in qualche modo più “disordinato” proprio ad indicare una casualità e libertà delle variazioni nucleotidiche.

I valori di divergenza intra specie sono comunque pari a zero in tutti i casi fatta eccezione per *Acer monspessulanum*; i due campioni di questa specie infatti mostrano una divergenza intraspecifica pari a 0.1916 % con uno dei due aplotipi identico ad *Acer obtusatum*. Questo inaspettato quadro ha senza dubbio bisogno di ulteriori conferme attraverso un più dettagliato studio di genetica di popolazione in entrambe le specie ma, comunque, nel contesto del DNA barcode oggetto del nostro studio, determinerà naturalmente un fallimento nel discriminare la specie. Infatti in entrambi gli esperimenti (clustering e similarità) queste 2 specie non saranno correttamente discriminate.

Questa regione resta tuttavia molto interessante e promettente come regione barcode con valori di successo superiori al 75 % come riportato nelle tabelle relative agli esperimenti.

L'unione delle 3 regioni cloroplastiche (solo esperimento Clustering) non ha portato a migliori prestazioni, e i valori percentuali di successo nel discriminare le specie sono gli stessi che la regione trnH-psbA mostra singolarmente (Tab. 13).

Nella regione nucleare ITS troviamo livelli di polimorfismo e divergenza nettamente maggiori rispetto a tutti gli altri marcatori, come mostrato nelle tabelle 3 e 11. Nel grafico della variabilità ritroviamo lo stesso tipo di polimorfismo “random”, già osservato nell'altra regione spaziatrice, qui interrotto dalla zona centrale assolutamente conservata e monomorfica che corrisponde alla regione codificante la subunità ribosomale 5,8S.

Tuttavia questo maggiore polimorfismo e variabilità, non determina un maggiore potere discriminante rispetto alla regione spaziatrice cloroplastica e possiamo, in questo contesto, affermare che i risultati ottenuti sono identici per entrambi i marcatori. La percentuale di successo è anche qui del 75% nei due esperimenti. Purtroppo non sono disponibili i dati relativi alla variabilità intraspecifica che avrebbero forse potuto completare meglio lo studio di questo marcatore.

Come intuibile da quanto detto sopra, l'applicazione dei due diversi metodi, Clustering e Similarità, non ha sottolineato particolari vantaggi o problematiche. Questo è probabilmente dovuto al fatto che le cause del “fallimento” nel discriminare la specie, sono determinate da sequenze che, pur essendo di specie diverse, sono esattamente identiche (100% di similarità).

Questo non ha dunque consentito di valutare pienamente le potenzialità dei due metodi in diverse circostanze ma di contro evidenzia una problematica riscontrata anche in altri generi studiati dal nostro gruppo (dati non mostrati).

Infatti, questa totale similarità fra sequenze di diverse specie che potrebbe essere dovuta a bassi tassi evolutivi, a fenomeni di ibridazione etc., potrebbe pregiudicare, se confermata su larga scala, l'applicazione della tecnica barcode, perlomeno attraverso i marcatori finora studiati.

Infine è noto che gli studi sul DNA barcode, attraverso l'esplorazione delle caratteristiche dei diversi marcatori, possono essere un utile complemento agli studi di genetica di popolazione e filogenesi.

Infatti lo studio del nostro dataset ha evidenziato una interessante caratteristica nel marcatore cloroplastico trnH-psbA. Come mostrato in Par. 7.6, blocco3 e blocco 1, una inserzione di 7 bp e una delezione di 9 bp sono presenti in tutti gli individui delle specie della Sezione *Platanoidea*.

Questo confermerebbe, a livello molecolare, l'origine monofiletica di questo gruppo, già evidenziata in passato, dalla tassonomia classica, esclusivamente in base ad indagini morfologiche (Dendrogramma n. 6).

Per concludere questo primo approccio della tecnica barcoding alle specie italiane afferenti al genere *Acer* ha mostrato risultati incoraggianti e non ha evidenziato particolari difficoltà metodologiche prospettando quindi una possibile applicazione di questo metodo anche ad altre specie di interesse forestale.

Northern Hemisphere

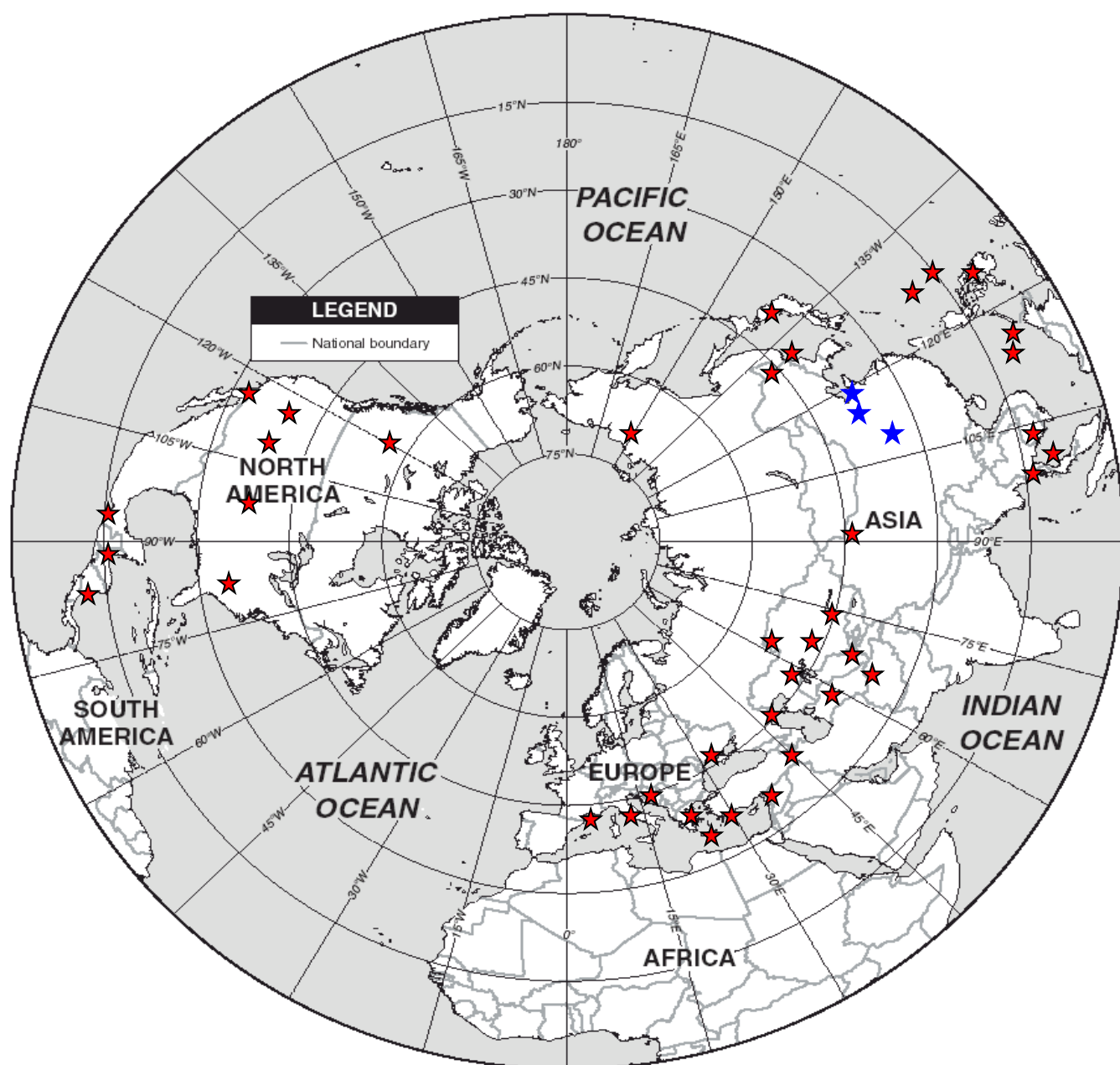


Tavola 1. Centri di origine (★) e di maggior diffusione (★) del genere *Acer* spp.

9.BIBLIOGRAFIA

1. _____ 1911b. *Revisio Aceracearum Japonicarum*. J. Coll. Sci. Univ. Tokyo 32 (1): 1-75.
2. Aldrich J. B. W. Cherney E. Merlin L. Christopherson 1988 The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14: 137-146.
3. Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
4. **Álvarez I. and J. F. Wendel, 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 29, Issue 3, December 2003, pg. 417-434
5. Baldwin B.G., 1992. Phylogenetic utility of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 1, No. 1, March, pp. 3-16, 1992.
6. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J., 1995: The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann. Bot. Gard.* 82, 247-277.
7. Bellarosa R., Simeone M.C., Papini A., Schirone, B., (2005) Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.. *Mol. Phyl. Evol.* 34: 355-370.
8. Bertolani Marchetti D. 1985. *Pollen paleoclimatology in the Mediterranean since Messinian time*, in STANLEY D.J. e WEZEL F.-C. (ed.) "*Geological evolution of the mediterranean Basin*", Springer Verl., New York,
9. Bertolani Marchetti D. *et al.* 1979. Palynology and stratigraphy of the Pilo-Pleistocene sequence of the Stirone River(northern Italy), *Pollen et Spores*, 21: 149-167.
10. Bertoldi R. 1985. Paleostratigrafia in sedimenti marini del Pliocene della Sicilia e considerazioni paleoclimatiche, *Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sc. Mat., Fis., Nat.*, 78:157-164.
11. Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu YL, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Sytsma YJ, Michael HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedrén M, Gaut BS, Jansen RK, Kim YJ, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang QY, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E,

- Learn Jr. GH, Graham SW, Barrett SCH, Dayanandan S, Albert VA. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528–580.
12. Cronquist A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. The new York Botanical Garden. New York.
 13. Darlington C.D., and A. P. Wylie. 1955. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2nd ed. London: Allen & Unwin.
 14. De Jong P.C. 2001. Maples in Nature and in the Garden. *Maples of the world*. Chapter 6 . pp 69-103.
 15. Doyle J. J. Doyle J. L. 1988. Natural interspecific hibridization in eastern north American Claytonia. *American Journal of Botany*. 75: 1238-1246.
 16. Downie SR, Llanas E & Katz-Downie DS, 1996. Multiple independent losses of the *rpoC1* intron in angiosperm chloroplast DNA's. *Systematic Botany*, 21:135-151.
 17. Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, et al. (2008) Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS ONE* 3(7): e2802. doi:10.1371/journal.pone.0002802
 18. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
 19. Fiori A. 1907. *FLORA ITALICA EXSICCATA*.
 20. Firsov, G. A. 1982. To the question of geography and systematics of the genus *Acer* (Aceracee) *Botanicheskii Zhurnal* 67(8): 1082-1090.
 21. Gielly L. e Taberlet P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, Vol 11, 769-777,
 22. Gellini R. e Grossoni P. 1997. *Botanica forestale.II Angiosperme*. Cedam. Casa Editrice Dottor Antonio Milani.
 23. Gonzales D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistematica. *Revista Mexicana de micologia*. 14; 1-27.
 24. Gonzáles D., 1997. El uso de secuencias Génicas Para Estudios Taxonómicos *Bol. Soc. México*. 60 : 137-157.
 25. Halenius, J.P. 1750. *Plantae Rariores Camschatcenses*. Ph.D. thesis, Universiy of Uppsala, Sweden.
 26. Hall T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
 27. Hamilton M. B. 1999b Tropical tree gene flow and seed dispersal: deforestation affects the genetic structure of the surviving forest fragments. *Nature* 401: 129-130

28. Hayek A.e. von 1925. *A. campestre* ssp. *marsicum* (Guss) Hayek. Prodrumus Florae Peninsulare Balcanicae I. *Repert Sp. Nov. Beih.* 30 (1):601-607.
29. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. (2004a). Ten species in one: DANN barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 14812-14817.
30. Hebert PDN, Cywinska A., Ball SL., DeWaard JR (2003a). Biological identification through DANN barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270, 313-321.
31. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004b). Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Sciences, Biology*, 2, e312 (www.plosbiology.org).
32. Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. (2003b) *Proc. R. Soc. London Ser. B* 270, *Suppl. 1*, S96-S99.
33. Heuertz M., Carnevale S., Fineschi S., Sebastiani F., Hausman J. F., Paule L. and Vendramin G. G., 2006. Chloroplast DNA Phylogeography of european ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): Roles of hybridization and life history traits molecular ecology 15: 2131-2140.
34. Hillis D. M., C. Moritz and B. K. Mable. 1996 Molecular systematics, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
35. Hogg, I. D. & Hebert, P. D. N. (2004) *Can. J. Zool.* 82, 1-6.
36. Holmes, R. (2004) *New Sci.* 2453, 32-35.
37. Holdregger R. R. J. Abbott 2003 Phylogeography of the Arctic-Alpine *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence variation. *American Journal of Botany* 90: 931-936
38. Hoot SB, Culham A, Crane PR., 1995 The utility of atpB gene sequences in resolving phylogenetic relationships: comparison with rbcL and 18S ribosomal DNA sequences in the Lardizabalaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82. (2): 194-207 (1995) - *En Geog. Systematics: ANGIOSPERMAE (LARDIZABALACEAE)*.
39. Hudson G. S., T., A. Holton, P. R. Whitfeld and W. Bottomley. 1988 Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 200: 639-654.
40. Johnson L. A. e D. E. Soltis, 1994. matK DNA Sequences and Phylogenetic Reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany* Vol. 19, No. 1, pp. 143-156.

41. Judd W.S., Campbell C.S. , Kellogg E.A., Stevens P.F. Ed. It. *Botanica sistematica. Un approccio filogenetico.*
42. Kapralov M. V. and Filatov D. A., 2007. Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evol. Biol.*; 7: 73. Published online 2007 May 11. doi: 10.1186/1471-2148-7-73. PMCID: PMC1884142.
43. Kellogg, E. A. and N. D. Juliano. 1997. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *Am. J. Bot.* 84: 413-428.
44. Kim Y. D., Jansen R. K., 1994. Comparison of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 190: 157-185.
45. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
46. Koch K. H. E. 1869. *Dendrologie*. I. Erlangen: Enke.
47. Koidzumi, G.I. 1911a Observation on the *Aceraceae*. *Botanical Magazine, Tokyo* 25 : 42-61, 97-113.
48. Kress W. J. and Erikson D.L., 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non – Coding trnH-psbA Spacer Region. *PloS ONE* 2(6): e508. doi: 10.1371/journal.pone.0000.508.
49. Kress J, Erickson DL (2008) DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2761–2762.
50. Kress W. J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L A. e Janzen D. H. *Use of DNA barcodes to identify flowering plants.*
51. Krüssmann G. 1984 - 1986. *Manual of cultivated broad-leaved trees and shrubs*. BT Batsford, London.
52. Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G *et al.* (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2923–2928. doi:10.1073/pnas.0709936105.
53. Ledford H (2008). *Botanical identities: DNA barcoding for plants comes a step closer.* *Nature* 451: 616.
54. Linnaeus, C. 1737. *Hortus Cliffortianus*. Amsterdam. Rpt. J. Cramer, Lehre, 1966
55. Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. 1st ed. Stockholm.
56. Little DP, Stevenson DW (2007) A comparison of algorithms for the identification of specimens using DNA barcodes: examples from gymnosperms. *Cladistics* 23: 1–21.

57. Lovelock, 1988.
58. Maggini F., Marrocco M. e Gelati M. T. 1995. Evoluzione Molecolare delle sequenze nucleotidiche degli spaziatori interni dei geni per l'RNA ribosomale in angiosperme, gimnosperme e pteridofite. *Giornale Botanico Italiano*. 129; 45-56.
59. Muller, J. And P.W. Leenhouts. 1976. A general survey of pollen types in sapindaceae in relation to taxonomy. I the *Evolutionary*.
60. Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki K., Horn G.T., Herlich H.A., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263-273.
61. Olmstead R. G. and J. D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81: 890-903.
62. Olmstead R. G., Sweere J. A., 1994. Combining Data in Phylogenetic Systematics - an Empirical-Approach Using 3 Molecular-Data Sets in the Solanaceae. *Systematic Biology*: 43(4): 467-481.
63. Oterdoom H. J. 2001. Maples in Nature and in the Garden. Maples of the world. Chapter 1.pp 15-25.
64. Pax, F. 1885. Monographie der Gattung *Acer*. *Bot. Jahrb.* 6:287-347.
65. Pax, F. 1886. Monographie der Gattung *Acer*. *Bot. Jahrb.* 7:177-263.
66. Pennisi E (2007). Taxonomy. Wanted: a barcode for plants. *Science* 318: 190–191.
67. Perron M., Perry D. J., Andalo C. and Bousquet J., 2000. Evidence from sequence tagged-site markers of a recent progenitor-derivative species pair. *PNAS*. 97: 11331-11336.
68. Petit R.J. & Vendramin G.G. 2005: Phylogeography of organelle DNA in plants: an introduction. In: *Phylogeography of southern European refugia*. Weiss S., Ferrand N. (Eds.), Kluwer, Amsterdam: 23-97.
69. Pignatti S. 1997. Flora d'Italia. Volume 2°. Ed agricole
70. Pignatti S. 1998. I Boschi d'Italia. *Ginecologia e Biodiversità*. Scienze Forestali e Ambientali. UTET
71. Pignatti S. 1998. I boschi d'Italia. *Scienze Forestali e Ambientali*. UTET.
72. Pitelka LF, the plant migration workshop group (1997) Plant migration and climate change. *American Scientist* 85, 464-473.
73. Plant Phylogeography. Cap.II.
74. Pojarkova, A.I. 1932. *Acer turcomanicum*. *Delect. Sem. Hort. Bot. Acad. Sci. USSR* 1933:3.
75. Radde-Fomin O. 1934. *Journal Inst. Bot. Acad. Sc. Ukraine* 4,2: 328

76. Renner S. S. 1999 Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany* 86: 1301-1315
77. Rieserberg L. H. Carter R & Zona S. 1990. Molecular test of Hypothesized hybrid origin of two diploid *Helianthus* species (Asteraceae). *Evolution*. 44; 1498-1511.
78. Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messegyer, X. and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
79. Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
80. Sang T. D. J. Crawford T. F. Stuessy 1997 Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.
81. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. (2005). *Phil Trns R Soc London Ser B* 360: 1805-1811.
82. Siebold, P.F. von, and J.G. Zuccarini. 1845. *Florae Japonicae familiae naturales. Abh. Math.-Phys. Kl. K. Bayer. Akad. Wiss. Munchen* 4(2):154-159.
83. Soltis D. E., P. S. Soltis, and J. J. Doyle (eds.) 1998. *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing. Kluwer, Boston.*
84. Soltis DE, Tago-Nakazawa M, Xiang QY, Kawano S, Murata J, Wakabayashi M, Hibsich-Jetter C.. Phylogenetic relationships and evolution in *Chrysosplenium* (Saxifragaceae) based on matK sequence data. *Am J Bot.* 2001 May;88(5):883-893.
85. Stebbins, G.L. 1977. *Processes of Organic Evolution*. 3rd ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.
86. Strasburger E., F. Noll, H. Schenck e A. F. W. Schimper. *Trattato di Botanica*. 7 Edizione. Antonio Delfino Editore.
87. Suh Y., Thien H. E., Zimmer E. A. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed sequences of ribosomal DANN in Winteraceae. *Amer. J. Bot.* 80: 1042-1055.
88. Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
89. van Gelderen D.M., de Jong P.C. Oterdoom H. J., 1994. *Maples of the World*. Timber Press. Portland
90. van Gelderen D.M., de Jong P.C. Oterdoom H.J. 1994. *Maples of the world*. Timber Press. Portland.

91. Vogler A. P. and Monaghan M. T. , 2006. Recent advances in DNA Taxonomy. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* Doi:1-10.
92. Walther, H. 1972. Studien uber Tertiäre *Acer* Mitteleuropas. *Abh. Staatl. Mus.. Mineral. Geol. Dresden* 19:1-309
93. Walther, H. 1972. Studien über Tertiäre *Acer* Mitteleuropas. *Abh. Staatl. Mus. Mineral. Geol. Dresden* 19:1-309.
94. Wilson, E.O. 1992. *The Diversity of Life*. Belknap, Cambridge, Massachussets, USA.
95. Zurawski, G. e M.T. Clegg. 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA – encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 391-418.
96. [1] (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Ringraziamenti

I miei più sentiti ringraziamenti sono rivolti al Dott. Alessio Papini del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università degli Studi di Firenze, con il quale è stato concepito ed iniziato questo studio quattro anni fa, per i preziosi suggerimenti e commenti formulati durante lo svolgimento delle analisi.

Ringrazio la Dott.ssa Roberta Piredda del Dipartimento di Tecnologie, Ingegneria e Scienze dell'Ambiente e delle Foreste, Università della Tuscia per aver contribuito in modo impagabile nella fase delle elaborazioni informatiche e per avermi accompagnato con professionalità, competenza e pazienza in questo percorso di studi.

Ringrazio il Dr. Marco Cosimo Simeone e la Dott.ssa Laura Armenise del Dipartimento di Tecnologie, Ingegneria e Scienze dell'Ambiente e delle Foreste, Università della Tuscia per la Loro disponibilità e la Loro preziosa e fattiva collaborazione durante tutta la ricerca e per aver condiviso con me la Loro professionalità.

Al Prof. Bartolomeo Schirone rivolgo con affetto e stima tutta la mia gratitudine per avermi affiancata in questa esperienza condividendo con me le Sue riflessioni e le Sue idee ed arricchendomi con Suoi costruttivi suggerimenti.

Infine ringrazio ancora il Prof. Bartolomeo Schirone, il Dott. Marco Cosimo Simeone e la Dott.ssa Roberta Piredda per aver contribuito con i Loro tempestivi suggerimenti alla costruzione del progetto di ricerca e per aver messo a disposizione con costante dedizione e con generosità la Loro ricca esperienza nell'interpretazione dei risultati ottenuti.