

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

**Dipartimento di Produzione Vegetale
Dottorato in Ortoflorofrutticoltura - XXIII Ciclo**

**Caratterizzazione Genetica, Documentazione e Valorizzazione
di una Collezione di Germoplasma di *Limonium spp.*
con Metodi Biometrici e Biologico Molecolari.**

AGR/04

**Coordinatore
Prof. Alberto Graifenberg**

**Tutor
Dott. Gianluca Burchi**

**Dottoranda
Dr.ssa Angela Teani**

Sommario

Sommario	2
Capitolo 1	4
INTRODUZIONE	4
SISTEMATICA DEL GENERE LIMONIUM	4
<i>Classificazione di riferimento</i>	5
MECCANISMI DI RIPRODUZIONE.....	7
<i>Apomissia</i>	7
<i>Dimorfismo del polline e dello stamma</i>	7
<i>Ipotesi evolutive e formazione di ibridi</i>	9
<i>Miglioramento varietale del genere Limonium</i>	10
COLLEZIONE DI GERMOPLASMA DI LIMONIUM.....	11
<i>Implementazione del Trattato FAO per le Risorse Genetiche Vegetali</i>	14
LA CARATTERIZZAZIONE BIOMETRICA	15
<i>Parametri CPVO - UPOV</i>	15
<i>I parametri CPVO-UPOV nella discriminazione interspecifica</i>	23
CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICO MOLECOLARE.....	25
<i>L'uso dell'AFLP per il DNA fingerprinting di genomi complessi</i>	25
<i>I marcatori molecolari in Limonium sp.</i>	27
SCOPO DEL LAVORO	29
Capitolo 2	30
MATERIALI E METODI.....	30
MATERIALE VEGETALE.....	30
VALUTAZIONE MORFOMETICA	31
<i>Raccolta dei dati</i>	31
VALUTAZIONE MOLECOLARE	32
<i>Estrazione del materiale genetico (DNA) con protocollo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)</i>	32
<i>Restrizione- Ligazione (RL) con enzimi EcoRI e MseI</i>	33
<i>Preparazione Adattatori Eco/Mse</i>	33
<i>Ligazione (volume totale 20 µl)</i>	34
<i>Preamplificazione (PA)</i>	34

<i>Amplificazione AFLP</i>	35
<i>Allestimento della corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide</i>	36
<i>Colorazione Silver Staining</i>	38
Capitolo 3	39
RISULTATI E DISCUSSIONE	39
MARCATORI MORFOMETRICI	39
MARCATORI MOLECOLARI	43
<i>Estrazione del materiale genetico</i>	43
<i>Restrizione/Ligazione</i>	46
<i>Preamplificazione</i>	46
<i>Amplificazione</i>	47
<i>Corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide</i>	49
Capitolo 5	53
CONCLUSIONI	53
Capitolo 4	55
PUBBLICAZIONI E PRESENTAZIONI A CONVEGNI	55
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	56

Capitolo 1

INTRODUZIONE

SISTEMATICA DEL GENERE LIMONIUM

Il genere *Limonium* (fam. *Plumbaginaceae*) (Fig.1) è distribuito in un vasto areale che va dalle spiagge marine della regione mediterranea (in cui è localizzato il centro di diversificazione del genere) alle steppe dell'Asia centrale fino all'estremo oriente. Dal punto di vista sistematico sono stati fatti molti tentativi al fine stabilire in maniera chiara ed esaustiva i rapporti filogenetici esistenti all'interno di questo genere, nella maggior parte dei casi però si tratta di studi inerenti a specifici areali geografici (Ingrouille, 1984; Erben, 1993; Lledò *et al.*, 2003; Karis, 2004) mancanti quindi di una prospettiva globale.

Le informazioni più attendibili relativi al genere *Limonium* provengono dalle pubblicazioni di Boissier (1848, 1859) e di altri autori che seguirono le sue linee guida (Hooker, 1876; Pax, 1889).

Nello specifico Boissier divise il genere (precedentemente noto come *Statice*, nom. Rej. Vs. *Armeria*; Greuter *et al.*, 2000) in 14 sezioni appartenenti a due gruppi principali: “corolla polipetala” comprendente otto sezioni e “corolla gamopetala” con sei sezioni.

Recentemente queste informazioni sono state aggiornate anche se risultano ancora lacunose. Solo due sezioni del gruppo “corolla gamopetala” infatti risultano appartenenti con certezza al genere *Limonium* (*L. sez. Polyarthron* e *L. sez. Siphonantha*) (Lledò *et al.*, 2003) anche se

le relazioni filogenetiche di tali sezioni sono ancora da confermare. Per quanto riguarda il gruppo “corolla polipetala”, cinque delle sei sezioni risultano confermate con l’eccezione della sezione *Circinara* che risulta appartenere al genere *Afrolimon*.

Studi volti a chiarire la tassonomia del genere *Limonium* sono stati condotti da Pignatti (1971, 1972) che riarrangiò il genere per la *Flora Europae*. Le notizie tassonomiche risultano quindi inerenti ai *taxa* europei che furono divisi in tre sottogeneri.

Il sottogenere *Petroclados* comprendente in particolar modo le specie endemiche delle Isole Canarie; il sottogenere *Myriolepis* con tre sezioni (*L. sez. Myriolepis*, *Syphonanta* e *Polyarthron*); e il sottogenere *Limonium* comprendente il resto delle specie europee.

Tale sistema quindi non include tutte le specie di provenienza africana, americana e asiatica.

La nomenclatura utilizzata da Pignatti inoltre risulta obsoleta: molti nomi di specie infatti contengono ancora il termine *Statice*.

Classificazione di riferimento

L’estrema complessità del genere ha fatto sì che esistano diversi tipi di classificazioni, spesso anche poco attinenti l’una con l’altra. Questo aspetto rende necessario quindi compiere una scelta con lo scopo di assumere come punto di riferimento una classificazione chiara e abbastanza attendibile che possa fare da linea guida per il lavoro che ci siamo prefissi di condurre.

A questo proposito sembra più che mai adeguato rifarsi ad alcuni testi classici in campo tassonomico in grado di fornire uno schema chiaro ed efficace anche se meno approfondito di altri (Bayley, 1958; Chittenden, 1977).

Il genere *Limonium* secondo tale classificazione viene suddiviso in tre sottogeneri: *Goniolimon*, *Verilimonium* e *Siphonanta*.

Nel primo sottogenere vengono incluse specie come *L.tataricum*, perenne e di taglia ridotta (30 cm c.a), caratterizzata da foglie oblungh e, lanceolate, rigide e glabre e da infiorescenze con ramificazioni sottili e forma trialata. I fiori, minuti, hanno un calice bianco e vistoso dalla forma caratteristica e una corolla meno evidente di colore bianco o rosa.

Appartengono invece al secondo sottogenere molte delle specie più note di questo genere; dalle tipiche *L. gmelinii*, *L. latifolium* (perenni dal colore violetto della corolla, e calice di piccolissime dimensioni) a *L. sinensis* (particolarmente sfruttato in programmi di *breeding*) a specie dalla morfologia piuttosto particolare, alcune fra le più interessanti ed utilizzate per programmi di *breeding* a scopo commerciale, *L.sinuatum* e *L. bonduelli*, ma anche *L.perezii*,

specie originaria delle isole Canarie. L'aspetto morfologico caratteristico di tali specie è la vivacità e varietà del colore del calice e la presenza di alatura sullo stelo.

Il sottogenere *Siphonanta* invece comprende la particolarissima specie *L. suworovii*, annuale e di dimensioni molto ridotte, con foglie allungate, lanceolate e scapi fiorali costituiti da spighe terminali dense, i cui fiorellini possiedono un calice verde con lembo rosa scuro e corolla rosa-rosso.

Esiste in natura, nel genere *Limonium*, una larga variabilità genetica, espressa in un consistente numero di specie botaniche molto diverse tra loro, alcune distribuite in un vasto areale, molte altre endemiche ed estremamente localizzate: ciò fa ragionevolmente presupporre l'esistenza di ampie riserve di materiale ancora inesplorate. La stima del numero di specie appartenenti al genere *Limonium* varia tra 150 (Erben, 1979) e 350 (Kubitzki, 1993): tale approssimazione è dovuta alla continua descrizione di nuovi *taxa*, principalmente microspecie da zone geograficamente ristrette. La maggior parte di queste microspecie sono probabilmente agamosperme. (Diana et al., 1992).



Figura 1 - Estratto di tavole illustrate relative alle Plumbaginacee provenienti da “Flore complète de France, Suisse et Belgique, par Gaston Bonnier” 1911.

MECCANISMI DI RIPRODUZIONE

I meccanismi naturali di riproduzione del genere *Limonium* sono particolarmente complessi e caratterizzati da meccanismi di auto - incompatibilità: dimorfismo del polline, dello stilo e dello stimma (e quindi allogamia obbligata per le forme gamiche) che comportano una certa facilità a formare ibridi talvolta parzialmente fertili (Baker, 1953; Diana, 1992). Soltanto una minoranza di specie sessuate è monomorfica e autofertile (Cowan *et al.* 1998).

Apomissia

La presenza di apomissia nel genere *Limonium* è stata descritta per la prima volta da D'Amato (1949) in *Limonium virgatum* e correlata al fatto che la specie è triploide. Egli ha messo in evidenza che, mentre nelle cellule madri del polline la meiosi decorre, apparentemente, in maniera regolare con la formazione di tetradi di microspore, o eccezionalmente pentadi ed eptadi, nelle cellule madri delle megaspore si realizza generalmente un nucleo di restituzione, da cui traggono origine gametofiti 8-nucleati non ridotti (tipo *Ixeris*) (Diana, 1992).

Lo sviluppo dell'embrione è sempre autonomo e non viene influenzato dalla penetrazione del tubetto pollinico.

Tuttavia l'apomissia è solo una condizione parziale in quanto vi è un 20% di probabilità che avvenga un processo meiotico regolare.

Gli studi condotti da D'Amato puntualizzano sul fatto che probabilmente la condizione apomittica vada ricondotta ad entità di tipo triploide, e che sia per lo più facoltativa e non necessariamente legata alla ploidia (Diana, 1992).

Dimorfismo del polline e dello stimma

Il fenomeno dell'eterostilia e dell'eteromorfismo del polline e dello stimma va interpretato come una realizzazione di barriere morfologiche al fine di impedire l'auto-fecondazione.

Normalmente il dimorfismo degli stimmi si manifesta con una differenza di dimensioni e di forme delle cellule delle superfici stigmatiche; mentre il dimorfismo del polline, nella

maggior parte dei casi, con una differenza di dimensioni rispetto allo stimma, o una differente scultura dell'esina.

In particolare nel genere *Limonium* vengono descritti due tipi di stimmi (Baker 1948, 1953): "papilloso" e "a pannocchia". Il dimorfismo dello stimma è correlato al dimorfismo del polline che si presenta in genere tricolpato e con ornamentazioni dell'esina molto differenti: tipo A, con esina reticolata, e tipo B, finemente reticolato (Weber, 1981).

Il sistema di incompatibilità maggiormente presente nel genere *Limonium* è di tipo eteromorfo (Baker, 1954) con due combinazioni autoincompatibili: polline tipo A con stimma "a pannocchia", polline di tipo B con stimma "papilloso".

Esistono inoltre diverse specie monomorfe che presentano combinazioni polline-stimma autoincompatibili, tali specie sono da considerarsi apomittiche (Fig.2) (Baker, 1966).

Per quanto riguarda le specie appartenenti al bacino mediterraneo è possibile trovare quattro combinazioni polline-stimma: A/"a pannocchia", B/"papilloso" e, più raramente, A/"papilloso", B/"a pannocchia". Tali specie sono compatibili, quindi autogame (Erben, 1978). Lo stesso studio evidenzia come l'agamospermia sia una condizione propria di popolazioni monomorfe autoincompatibili. Inoltre le specie diploidi o poliploidi con numeri cromosomici pari sarebbero dimorfe, quindi gamiche. Mentre le specie triploidi o poliploidi, con numero cromosomico dispari, sarebbero monomorfe incompatibili, con polline quasi completamente sterile, quindi apomittiche.

Esistono tuttavia delle eccezioni, con specie che, a prescindere dalla morfologia dello stimma, sono in grado di produrre semi fertili se associate a polline di tipo B (sia tramite gamia, che tramite apomissia) (Dulberger e Dvoskin-Doron, 1989).

Appare quindi evidente come il rapporto fra la ploidia e i meccanismi riproduttivi esistenti nel genere *Limonium* non sia sempre chiaro .

Ciò potrebbe essere legato al fatto che nel corso dell'evoluzione del genere sono avvenute ibridazioni tra differenti genomi, unite a fenomeni di apomissia che hanno contribuito a rendere instabile l'equilibrio genetico e riproduttivo del genere dando luogo ad situazioni cariologiche inconsuete (Diana, 1992).

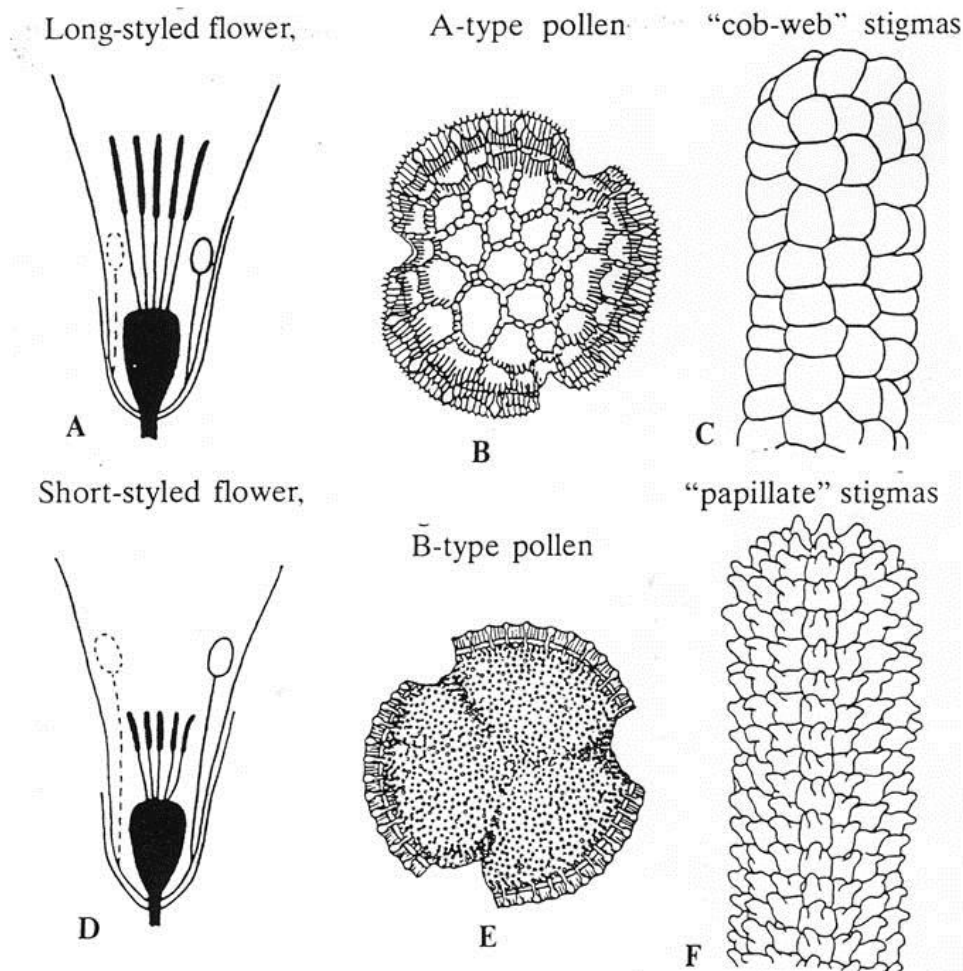


Figura 2 - Fiori con stilo lungo producono polline tipo-A e possiedono uno stimma “a pannocchia”. Fiori con stilo corto producono polline tipo-B e possiedono stimma “papilloso” (Baker, 2000)

Ipotesi evolutive e formazione di ibridi

Con l'analisi dei dati cariologici è possibile formulare un'ipotesi evoluzionistica del genere *Limonium*. Gli individui triploidi si sarebbero originati dall'ibridazione fra specie diploidi sessuate e specie tetraploidi sessuate (Dolcher e Pignatti, 1971). Molte delle specie triploidi originate sarebbero poi passate a fenomeni di riproduzione apomittici dando luogo quindi a eventi microevolutivi.

Ulteriori studi (Erben, 1979) hanno messo in evidenza come le specie con numero cromosomico triploide avrebbero avuto origine da ibridi di specie sessuate ($2n=16$ o 18) attraverso la fusione di un gamete non ridotto e un gamete ridotto (es. $2n=26=16+9$). Le specie tetraploidi invece deriverebbero dalla fusione di un gamete triploide non ridotto derivato da una agamosperma e un gamete sessuato aploide (es. $2n=35=26+9$).

Non è quindi infrequente, soprattutto nell'ambito di popolazioni simpatriche, il rinvenimento di specie con caratteristiche morfologiche intermedie, considerate quindi come "nuovi ibridi", originati da incroci fra specie diploidi e triploidi, o fra due specie triploidi. La diffusione per agamospermia contribuisce poi all'origine di popolazioni considerate "agamospecie".

Ciò ha portato ad una grande differenziazione dei cariotipi nelle varie entità e ad una frammentazione tassonomica in entità endemiche difficilmente classificabili ad areale.

Miglioramento varietale del genere Limonium

Dato che nelle piante *ornamentali* il continuo rinnovo varietale e la creazione di nuovi modelli (novità) sono di fatto elementi essenziali per il successo economico del prodotto, le caratteristiche botaniche e biologiche esposte finora rendono il *Limonium* una coltura dalle notevoli prospettive di sviluppo commerciale. Per quello che maggiormente può interessare gli ibridatori, la facilità e la frequenza con cui in natura si sviluppano ibridi interspecifici spontanei fa ben sperare per l'ottenimento di nuovi ibridi interspecifici mediante impollinazioni manuali controllate.

Da quanto esposto sopra, si evidenzia l'importanza di un programma di miglioramento genetico sul *Limonium* per incrementare le possibilità di successo della coltura.

Il fatto che il *Limonium* sia una tipica pianta a bassa energia, molto rustica, che non richiede particolari tipi di terreno (va bene su qualunque tipo di suolo sufficientemente drenato) né elevati livelli di fertilizzazione, che può essere coltivata anche all'aperto (è sufficiente una modesta copertura per proteggere i fiori dalla pioggia alla raccolta), rende questo genere adatto alla coltivazione in zone marginali, soprattutto del nostro meridione. Il *Limonium* presenta inoltre un notevole adattamento alle condizioni pedoclimatiche mediterranee, soprattutto riguardo alla resistenza alla salinità (Rivoal e Hanson 1993, 1994; Duhaze *et al.* 2003) ed agli stress idrici (Hanson *et al.*, 1994).

A tutto ciò si aggiungono le caratteristiche estetiche attraenti degli steli fioriti, oltre ad una longevità post-raccolta discreta come prodotto reciso fresco, eccezionale come prodotto reciso essiccato. Inoltre, come caratteristica fondamentale per un nuovo prodotto che si accinge a conquistare nuove quote di mercato nel comparto floricolo, il *Limonium* si adatta perfettamente alla micropropagazione *in vitro* (che fornisce piante a crescita più uniforme, con steli fiorali più alti, migliore colorazione dei fiori e maggiore durata in vaso) e risponde bene anche alla manipolazione *in vitro* (rigenerazione di piante complete a partire da protoplasti o da tessuti fogliari, trasformazione genetica, etc).

COLLEZIONE DI GERMOPLASMA DI LIMONIUM

Negli ultimi dieci anni il CRA-VIV di Pescia, il CRA-FSO di Sanremo ed il CRA-SFM di Palermo hanno intrapreso diverse attività di ricerca finalizzate alla valorizzazione del *Limonium*.

L'attività di conservazione iniziò in seguito al reperimento ed alla successiva messa in coltivazione di diversi genotipi utilizzati in un programma di *breeding* nell'ambito del "Progetto Finalizzato Floricoltura" del Mi.P.A.A.F. Più di 80 diversi genotipi di *Limonium*, provenienti da tutto il mondo, furono reperiti presso istituzioni di ricerca e ditte sementiere italiane e straniere. Fu così allestita una collezione di germoplasma piuttosto ampia comprendente 21 specie botaniche e 14 varietà.

A partire dal 2002, la collezione di *Limonium* (Fig. 3) fu in parte trasferita a Pescia ed ampliata con il reperimento sui litorali italiani ed areali europei di diverse specie selvatiche.

Attualmente la collezione comprende genotipi appartenenti a 16 specie diverse e 71 accessioni selvatiche di provenienza principalmente corsa, sarda, siciliana, toscana, pugliese, spagnola, greca ed ungherese (Tab. 1).

Tabella 1- Elenco delle specie presenti in collezione con relativo numero di accessioni disponibili e provenienze

Specie	Accessioni	Provenienza
<i>L. aureum</i>	1	Preesistente in collezione, probabilmente non linea pura
<i>L. binervosum</i>	6	Preesistente in collezione
<i>L. bonduelli</i>	1	Reperito presso la ditta “Bindi Sirio” probabilmente non linea pura
<i>L. densissimum</i>	6	Preesistente in collezione
<i>L. deracifolium</i>	2	Probabilmente sinonimo di <i>L. binervosum</i> Preesistente in collezione.
<i>L. gmelinii</i>	10	Preesistente in collezione
<i>L. gougetianum</i>	5	Preesistente in collezione
<i>L. latifolium</i>	8	Preesistente in collezione
<i>L. otolepis</i>	3	Preesistente in collezione
<i>L. perezii</i>	1	Reperito presso il CRA-FSO di Sanremo
<i>L. serotinum</i>	9	Preesistente in collezione
<i>L. sinensis</i>	10	Preesistente in collezione
<i>L. sinuatum</i>	1	Reperito presso il CRA di Bagheria (PA)
<i>L. suworovii</i>	-	Semi acquistati presso B&T seed company
<i>L. tataricum</i>	3	Preesistente in collezione
<i>L. virgatum</i>	5	Preesistente in collezione

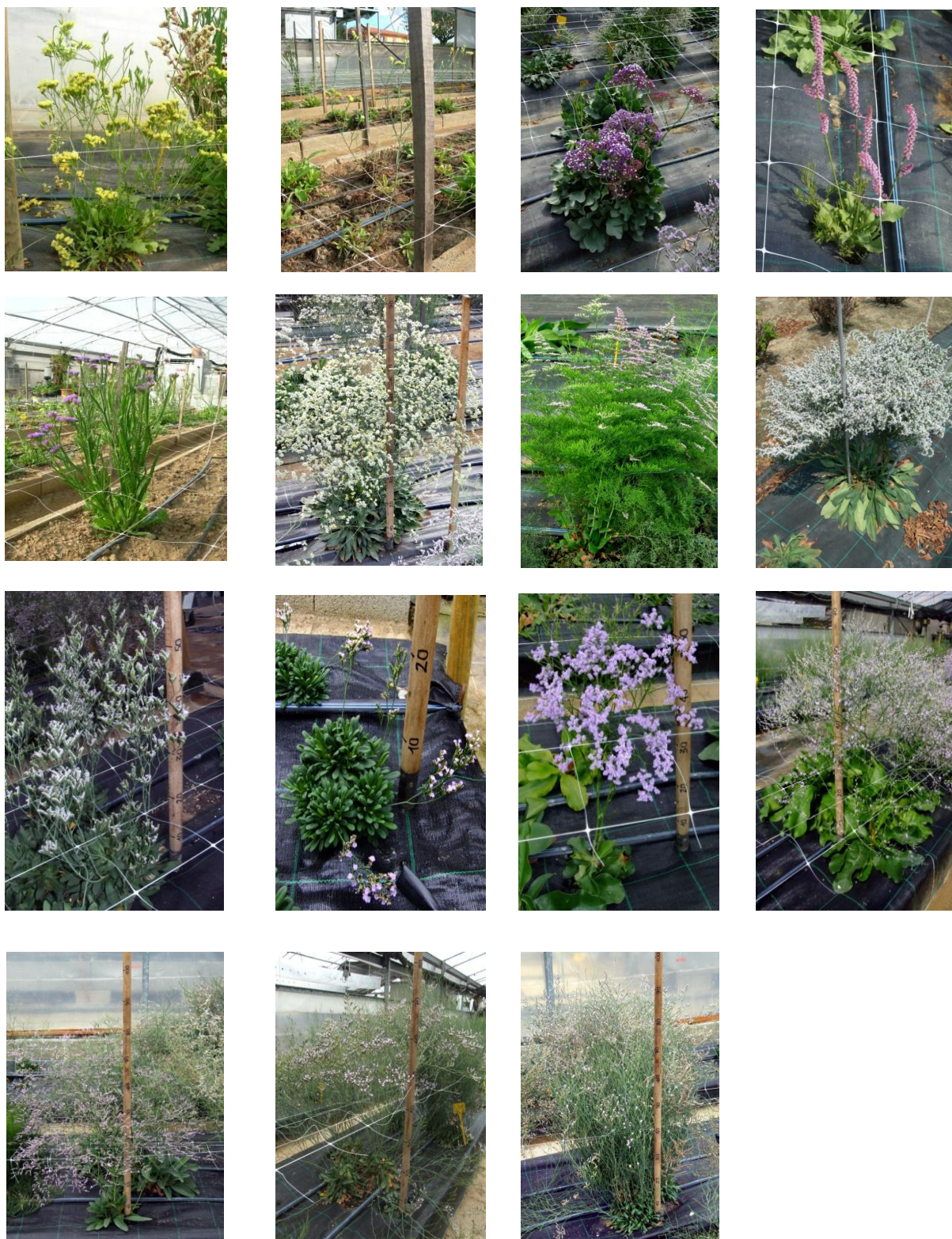


Figura 3 - Panoramica esemplificativa delle accessioni più rappresentative di ogni specie presente nella collezione del CRA VIV di Pescia. Da sinistra in alto: *L. bonduelli*, *L. aureum*, *L. perezii*, *L. suworovii*, *L. sinuatum*, *L. sinensis*, *L. otolepis*, *L. tataricum*, *L. binervosum*, *L. gougetianum*, *L. gmelinii*, *L. latifolium*, *L. serotinum*, *L. densissimum*, *L. virgatum*.

Implementazione del Trattato FAO per le Risorse Genetiche Vegetali

Nell'ultimo secolo si sta assistendo sempre di più ad una perdita di diversità genetica nel campo delle principali specie alimentari ed agronomiche dovuta a programmi di miglioramento genetico volti ad ottenere varietà commerciali sempre più uniformi e redditizie. A questo proposito il Trattato Internazionale per le Risorse Genetiche Vegetali per l'Alimentazione e l'Agricoltura (RGV-FAO) si è prefisso il compito di tutelare e valorizzare il patrimonio genetico vegetale mondiale, mettendo a punto programmi di gestione e conservazione del germoplasma.

Responsabile del Trattato a livello nazionale è il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali che avvalendosi della collaborazione di Istituti di ricerca pubblica e privata ed Associazioni non governative contribuirà alla costruzione di un sistema multilaterale di accesso e scambio delle risorse genetiche coordinato dalla FAO.

Il programma di implementazione del trattato interessa specie vegetali autoctone italiane: cereali, ortaggi, frutta, colture foraggere, colture di interesse industriale, specie ornamentali, piante medicinali ed aromatiche. Nel caso specifico, fra le ornamentali troviamo il *Limonium* che si colloca come uno dei generi autoctoni italiani e mediterranei con il maggior patrimonio genetico per quanto riguarda il numero di specie identificate e disponibili a livello di germoplasma. Buona parte del germoplasma disponibile per il *Limonium* è conservato presso il CRA-VIV di Pescia.

LA CARATTERIZZAZIONE BIOMETRICA

Parametri CPVO - UPOV

I marcatori biometrici attualmente rappresentano lo strumento ufficiale per caratterizzare il materiale vegetale in base a criteri di particolarità, uniformità e stabilità. Essi infatti sono stati adottati dall'Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà Vegetali (UPOV) come strumento di caratterizzazione e protezione di nuove varietà a livello comunitario. L'attuazione ed applicazione del regime di protezione comunitaria sono di pertinenza delle Ufficio Comunitario delle Varietà Vegetali (CPVO).

Tali parametri costituiscono quindi la principale risorsa per l'ottenimento di privative in ambito europeo.

Nello specifico si tratta di una serie di parametri di tipo biometrico che individuano in maniera univoca le caratteristiche fenotipiche di una varietà. Tali parametri esistono per tutte le varietà vegetali sia orticole che frutticole che ornamentali.

Nel caso specifico del *Limonium* il protocollo UPOV è ritenuto valido per *Limonium* Mill., *Goniolimon* Boiss. e *Psylliostachys* (Jaub. & Spach) Nevski (UPOV, 1999).

Volendo caratterizzare una varietà di *Limonium* quindi si andrà a seguire un protocollo specifico che prevede di raggruppare le varietà tra loro comparabili secondo alcuni caratteri principali: altezza, forma della lamina fogliare, tipo di infiorescenza, colore principale del calice, colore principale della corolla. Tali parametri risultano essere i più uniformi, stabili, o comunque soggetti a lievi variazioni ed inoltre risultano essere quelli maggiormente discriminanti ed informativi ai fini della discriminazione varietale.

All'interno della singola varietà poi vengono presi in esame un totale di 37 parametri relativi all'architettura della pianta: foglia, peduncolo, infiorescenza, calice, corolla, rosetta fogliare, fiore, stimma, periodo di fioritura (Fig. 4)

Affinché tali test siano efficaci e vengano presi in considerazione a livello ufficiale è necessario rispettare una serie di direttive relative al materiale da esaminare; i test devono essere condotti su un minimo di 20 individui per varietà, le piante devono essere in piena fioritura e devono appartenere al medesimo ciclo colturale. I test devono essere inoltre condotti sempre nello stesso luogo, e nello stesso periodo.

In base ai risultati dei test sarà stabilito se la varietà rispetta i parametri di distinzione, uniformità e stabilità.

Tali test risultano informativi a livello varietale poiché si tratta di individui in genere uniformi e dalle caratteristiche morfologiche estremamente simili, in questo senso quindi un alto numero di descrittori risulta necessario per andare a determinare l'uniformità della varietà (Teani *et al.*, 2011).

VII. Table of Characteristics/Tableau des caractères/Merkmalstabelle/Tabla de caracteres

	English	français	deutsch	español	Example Varieties Exemples Beispielssorten Variedades ejemplo	Note/ Nota
1. (*)	Plant: height	Plante: hauteur	Pflanze: Höhe	Planta: altura		
	very short	très basse	sehr niedrig	muy bajo		1
	short	basse	niedrig	bajo	<i>Goniolimon tartaricum</i>	3
	medium	moyenne	mittel	medio	Midnight Blue	5
	tall	haute	hoch	alto	<i>L. bellidifolium</i>	7
	very tall	très haute	sehr hoch	muy alto		9
2.	Plant: number of inflorescences	Plante: nombre d'inflorescences	Pflanze: Anzahl Blütenstände	Planta: número de inflorescencias		
	few	petit	gering	bajo	Superlady	3
	medium	moyen	mittel	medio	Midnight Blue	5
	many	grand	groß	alto	Goldmine, White Charm	7
3. (*)	Leaf: length (petiole included)	Feuille: longueur (pétiole inclus)	Blatt: Länge (einschließlich Blattstiel)	Hoja: longitud (pecíolo incluido)		
	very short	très courte	sehr kurz	muy corta	<i>L. minutum</i>	1
	short	courte	kurz	corta	<i>L. tetragonum</i>	3
	medium	moyenne	mittel	media	Midnight Blue	5
	long	longue	lang	larga	<i>L. perezii</i>	7
	very long	très longue	sehr lang	muy larga	Daijenne, Superlady	9
4. (*)	Leaf: width	Feuille: largeur	Blatt: Breite	Hoja: anchura		
	very narrow	très étroite	sehr schmal	muy estrecha	Goldmine	1
	narrow	étroite	schmal	estrecha	<i>Goniolimon tartaricum</i>	3
	medium	moyenne	mittel	media	Midnight Blue	5
	broad	large	breit	ancha	Misty Blue	7
	very broad	très large	sehr breit	muy ancha	Daijenne	9
5. (*) (+)	Leaf: shape of blade	Feuille: forme du limbe	Blatt: Form der Spreite	Hoja: forma del limbo		
	elliptic	elliptique	elliptisch	elíptica	Goldmine	1
	broad ovate to deltoid	ovale large à triangulaire	breit eiförmig bis dreieckig	oval ancha a triangular	Daibumo	2
	narrow obovate	obovale étroit	schmal verkehrt eiförmig	oboval estrecha	Midnight Blue	3
	obovate	obovale	verkehrt eiförmig	oboval	Misty Blue	4

6.	Leaf: intensity of green color	Feuille: intensité de la couleur verte	Blatt: Intensität der Grünfärbung	Hoja: intensidad del color verde		
	light	claire	hell	claro	<i>L. bonduellei</i>	3
	medium	moyenne	mittel	medio	<i>L. perezii</i>	5
	dark	foncée	dunkel	oscuro	<i>Goniolimon tartaricum</i>	7
7.	Leaf: glossiness	Feuille: brillance	Blatt: Glanz	Hoja: brillo		
	weak	faible	gering	débil	<i>L. bellidifolium</i>	3
	medium	moyenne	mittel	medio	<i>L. perezii</i>	5
	strong	forte	stark	fuerte	<i>Goniolimon tartaricum</i>	7
8.	Leaf: hairiness	Feuille: pilosité	Blatt: Behaarung	Hoja: vellosoidad		
	absent	absente	fehlend	ausente	Daibumo, Emille	1
	present	présente	vorhanden	presente	Early Blue Birds, White Charm	9
9.	Leaf: density of hairiness on upper side	Feuille: densité de la pilosité sur la face supérieure	Blatt: Dichte der Behaarung der Oberseite	Hoja: densidad de la vellosoidad del haz		
	sparse	lâche	locker	laxa	<i>L. bonduellei</i>	3
	medium	moyenne	mittel	media	Midnight Blue	5
	dense	dense	dicht	densa		7
10.	Leaf: density of hairs on margin	Feuille: densité de la pilosité du bord	Blatt: Dichte der Behaarung des Randes	Hoja: densidad de la vellosoidad del margen		
	very sparse	très lâche	sehr locker	muy laxa	Emille, Superlady	1
	sparse	lâche	locker	laxa	The Blues	3
	medium	moyenne	mittel	media	Crystal Pink	5
	dense	dense	dicht	densa	White Charm	7
11.	Leaf: undulation of margin	Feuille: ondulation du bord	Blatt: Randwellung	Hoja: ondulación del margen		
	absent or very weak	absente ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil	Daidelft	1
	weak	faible	gering	débil		3
	medium	moyenne	mittel	media	Avignon	5
	strong	forte	stark	fuerte	Goldmine	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9

12.	Leaf: lobing	Feuille: découpe du bord	Blatt: Lappung	Hoja: lobulado		
	absent	absente	fehlend	ausente	Emille, Goldmine	1
	present	présente	vorhanden	presente	Crystal Dark Blue	9
13. (*)	Leaf: intensity of lobing	Feuille: intensité de la découpe du bord	Blatt: Intensität der Lappung	Hoja: intensidad del lobulado		
	very weak	très faible	sehr gering	muy débil	<i>L. altaica</i>	1
	weak	faible	gering	débil	<i>L. bondueliei</i>	3
	medium	moyenne	mittel	medio	Midnight Blue	5
	strong	forte	stark	fuerte	White Charm	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
14.	Petiole: presence	Pétiole: présence	Blattstiel: Vorhandensein	Pecíolo: presencia		
	absent	absent	fehlend	ausente	Goldmine, Superlady	1
	present	présent	vorhanden	presente	Daibumo	9
15.	Petiole: length	Pétiole: longueur	Blattstiel: Länge	Pecíolo: longitud		
	very short	très court	sehr kurz	muy corto	Misty Blue	1
	short	court	kurz	corto	Miochar	3
	medium	moyen	mittel	medio	Emille	5
	long	long	lang	largo	Daijenne, Pioneer	7
	very long	très long	sehr lang	muy largo		9
16.	Petiole: intensity of anthocyanin coloration	Pétiole: intensité de la pigmentation anthocyanique	Blattstiel: Intensität der Anthocyanfärbung	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antocianica		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
	weak	faible	gering	débil	Avignon, Euro Blue	3
	medium	moyenne	mittel	media	Misty Blue	5
	strong	forte	stark	fuerte	Daicean, Pioneer	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
17. (*)	Inflorescence: stem leaves	Inflorescence: feuilles sur la tige	Blütenstand: Stielblätter	Inflorescencia: hojas del tallo		
	absent	absentes	fehlend	ausente	Avignon, Emille	1
	present	présentes	vorhanden	presente	Misty Blue	9
18. (*)	Inflorescence: length of peduncle	Inflorescence: longueur du pédoncule	Blütenstand: Länge des Stieles	Inflorescencia: longitud del pedúnculo		
	short	court	kurz	corto	Emille	3
	medium	moyen	mittel	medio	Goldmine	5
	long	long	lang	largo	Misty Blue	7

19.	Inflorescence: thickness of peduncle	Inflorescence: épaisseur du pédoncule	Blütenstand: Dicke des Stieles	Inflorescencia: grosor del pedúnculo		
	thin	fin	dünn	delgado	Goldmine	3
	medium	moyen	mittel	medio	Emille	5
	thick	gros	dick	grueso	Daijenne	7
20.	Inflorescence: hairiness of peduncle	Inflorescence: pilosité du pédoncule	Blütenstand: Behaarung des Stieles	Inflorescencia: velloso del pedúnculo		
	absent or very sparse	absente ou très lâche	fehlend oder sehr locker	ausente muy laxa	Emille	1
	sparse	lâche	locker	laxa	Daiblu, Rose Light	3
	medium	moyenne	mittel	media	Midnight Blue	5
	dense	dense	dicht	densa		7
	very dense	très dense	sehr dicht	muy densa		9
21. (*)	Inflorescence: width of wing of peduncle (at central third)	Inflorescence: épaisseur de l'aile du pédoncule (au tiers moyen)	Blütenstand: Breite des Flügels des Stieles (im mittleren Drittel)	Inflorescencia: anchura del ala del pedúnculo (en el tercio medio)		
	absent or very narrow	nulle ou très étroite	fehlend oder sehr schmal	ausente o muy estrecha	Daijenne, Misty Blue, St. Pierre	1
	narrow	étroite	schmal	estrecha	Daimarin	3
	medium	moyenne	mittel	media	Midnight Blue	7
	broad	large	breit	ancha	Early Blue Birds	9
	very broad	très large	sehr breit	muy ancha		
22.	Inflorescence: degree of undulation of margin of wing of peduncle	Inflorescence: degré de l'ondulation du bord de l'aile du pédoncule	Blütenstand: Stärke der Randwellung des Flügels des Stieles	Inflorescencia: grado de ondulación del margen del ala del pedúnculo		
	absent or very weak	nulle ou très faible	fehlend oder sehr gering	ausente o muy débil		1
	weak	faible	gering	débil	Pink Birds	3
	medium	moyenne	mittel	media	Daipink	5
	strong	forte	stark	fuerte	Early Blue Birds	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte	Violet Birds	9
23.	Inflorescence: length of stipules at first branch	Inflorescence: longueur des stipules au premier rameau	Blütenstand: Länge der Nebenblätter am ersten Zweig	Inflorescencia: longitud de las estípulas en la primera rama		
	absent or very short	absents ou très courts	fehlend oder sehr kurz	ausente o muy cortas	Avignon, Emille	1
	short	courts	kurz	cortas	Daimarin	3
	medium	moyens	mittel	medias	Daiblu	5
	long	longs	lang	largas	Violet Birds	7
	very long	très longs	sehr lang	muy largas		9

24. (*) (+)	Inflorescence: type	Inflorescence: type	Blütenstand: Typ	Inflorescencia: tipo		
	type I	type I	Typ I	tipo I	Très Bien	1
	type II	type II	Typ II	tipo II	Midnight Blue	2
	type III	type III	Typ III	tipo III	<i>L. perezii</i>	3
	type IV	type IV	Typ IV	tipo IV	Emille	4
	type V	type V	Typ V	tipo V	<i>L. bellidifolium</i>	5
	type VI	type VI	Typ VI	tipo VI	<i>P. suworowii</i>	6
25.	Inflorescence: degree of ramification of peduncle	Inflorescence: degré de ramification du pédoncule	Blütenstand: Stärke der Verzweigung des Stieles	Inflorescencia: grado de ramificación del pedúnculo		
	very weak	très faible	sehr gering	muy débil	Superlady	1
	weak	faible	gering	débil	Daisplash	3
	medium	moyenne	mittel	medio	Emille	5
	strong	forte	stark	fuerte	Misty Blue	7
	very strong	très forte	sehr stark	muy fuerte		9
26. (*)	Inflorescence: attitude of lateral branches	Inflorescence: port des rameaux	Blütenstand: Haltung der Seitentriebe	Inflorescencia: porte de las ramas laterales		
	erect	dressé	aufrecht	erecto	Midnight Blue	1
	semi-erect	demi-dressé	halbaufrecht	semierecto	Emille	3
	horizontal	horizontal	waagerecht	horizontal	<i>Goniolimon tartaricum</i>	5
27. (*)	Inflorescence: number of flowers	Inflorescence: nombre de fleurs	Blütenstand: Anzahl Blüten	Inflorescencia: número de flores		
	few	petit	gering	bajo	Gold Coast	3
	medium	moyen	mittel	medio	Midnight Blue	5
	many	grand	groß	alto	<i>L. latifolium</i>	7
28.	Calyx: length	Calice: longueur	Kelch: Länge	Cáliz: longitud		
	short	court	kurz	corta	Emille, Misty Blue	3
	medium	moyen	mittel	media		5
	long	long	lang	larga	Violet Birds, White Charm	7
29. (*)	Calyx: diameter	Calice: diamètre	Kelch: Durchmesser	Cáliz: diámetro		
	small	petit	klein	pequeño	Emille	3
	medium	moyen	mittel	medio	Superlady, Violet Birds	5
	large	grand	groß	grande	Ballerina Rose	7
30. (*) (+)	Calyx: type	Calice: type	Kelch: Typ	Cáliz: tipo		
	campanulate	campanulé	glockenförmig	acampanada	Emille	1
	funnel shaped	en entonnoir	trichterförmig	en forma de embudo	Midnight Blue	2
	open campanulate	en cloche évasée	offen glockenförmig	acampanada abierta	Très Bien	3

31. (*)	Calyx: main color RHS Colour Chart (indicate reference number)	Calice: couleur principale Code RHS des cou- leurs (indiquer le numéro de référence)	Kelch: Hauptfarbe RHS-Farbkarte (Nummer angeben)	Cáliz: color prin- cipal Carta de colores RHS (indicar número de referencia)		
32.	Corolla: size small medium large	Corolle: taille petite moyenne grande	Krone: Größe klein mittel groß	Corola: tamaño pequeño medio grande	Misty Blue Emille Early Blue Birds, Violet Birds	3 5 7
33. (*)	Corolla: color RHS Colour Chart (indicate reference number)	Corolle: couleur Code RHS des cou- leurs (indiquer le numéro de référence)	Krone: Farbe RHS-Farbkarte (Nummer angeben)	Corola: color Carta de colores RHS (indicar número de referencia)		
34.	Flower: position of stigma relative to anthers above same level below	Fleur: position des stigmates par rap- port aux anthères au-dessus au même niveau au-dessous	Blüte: Position der Narben im Verhält- nis zu den Antheren oberhalb auf gleicher Höhe unterhalb	Flor: posición del estigma en relación a las anteras encima al mismo nivel debajo	Daicenu Misty Blue	1 2 3
35. (+)	Stigma: type cob type papillate type capitate type	Stigmate: type en forme d'épi de maïs papillifère capité	Narbe: Typ kolbenförmig papillisartig kopfförmig	Estigma: tipo en forme de espiga de maíz en forma de mariposa en forma de cabeza	Oceanic Blue Misty Pink	1 2 3
36.	Flower: fragrance absent present	Fleur: parfum absent présent	Blüte: Duft fehlend vorhanden	Flor: fragancia ausente presente	Crystal Dark Blue Superlady	1 9
37. (*)	Time of beginning of flowering early medium late	Époque de début de floraison précoce moyenne tardive	Zeitpunkt des Blühbeginns früh mittel spät	Fecha del comienzo de la floración precoz media tardía	Early Blue Daibblue, Emille Miochar	3 5 7

Figura 4 - Elenco dei 37 parametri morfometrici messi a disposizione dal CPVO per la discriminazione varietale in *Limonium* sp.

I parametri CPVO-UPOV nella discriminazione interspecifica

I parametri biometrici possono costituire un valido strumento per la caratterizzazione fenotipica interspecifica a scopi filogenetici. Esistono infatti nel genere *Limonium* alcuni aspetti morfologici in grado di discriminare le varie specie. In particolare la tipologia di infiorescenza (Fig. 5), la presenza di alatura sullo stelo, le dimensioni di calice e corolla, il colore, la forma del calice (Fig. 6) sono tutte caratteristiche morfologiche in grado di identificare in maniera certa una specie.

Alcuni altri caratteri invece risultano meno discriminanti ed al contrario potrebbero creare equivoci e errori nel caso in cui si vogliano utilizzare rilievi biometrici a scopo statistico.

A questo proposito è necessario, nel caso in cui si vogliano applicare i parametri CPVO-UPOV all'analisi filogenetica, modificare o ridurre i parametri a disposizione adattandoli alla valutazione interspecifica.

Una volta stabiliti i migliori parametri, la valutazione biometrica potrebbe rappresentare uno strumento rapido ed economico per ottenere alberi filogenetici con una discreta attendibilità.

Ad. 24: Inflorescence: type

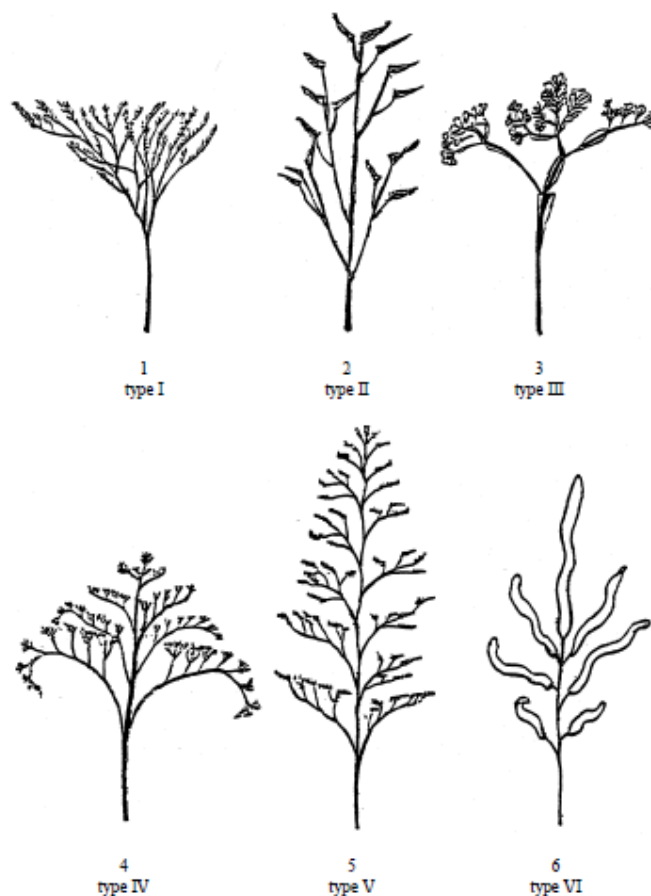


Figura 5 - Tipologie di infiorescenza descritte nelle linee guida del CPVO.

Ad. 30: Calyx: type

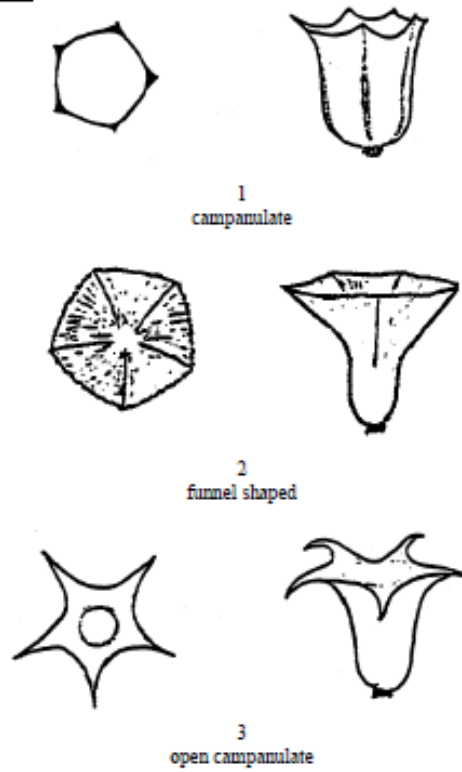


Figura 6 - Tipologie di calice descritte nelle linee guida del CPVO.

CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICO MOLECOLARE

Le tecniche di *fingerprinting* molecolare rappresentano un ottimo metodo per andare a determinare variazioni a livello genomico senza ricorrere al sequenziamento del DNA.

Attualmente vengono applicate varie metodologie che prevedono l'utilizzo della PCR al fine di individuare polimorfismi nelle piante. Tra questi le RAPD (Random-Amplified Polymorphic DNA), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e gli SSR (Microsatelliti o Simple Sequence Repeats) sono fra le più utilizzate. Tali tecniche tuttavia non sono interscambiabili.

Le RAPD rappresentano uno strumento veloce e piuttosto economico, ma hanno il grande svantaggio di essere poco riproducibili (Jones *et al.*, 1997).

La tecnica dell'AFLP invece, il cui metodo è stato sviluppato da Vos *et al.* (1995), permette una più ampia 'scansione' del genoma, fornendo un numero di bande molto alto, ed inoltre risulta molto più riproducibile rispetto alle RAPD.

Per quanto riguarda gli SSR, tali marcatori, essendo a singolo *locus*, risultano di interessante applicazione nella valutazione della natura ibrida di individui e nella caratterizzazione intraspecifica e permettono inoltre di stabilire se il polimorfismo sia presente solo su un allele o su entrambi (Powell *et al.*, 1996).

L'uso dell'AFLP per il DNA fingerprinting di genomi complessi

L'AFLP è una tecnica basata sull'identificazione a livello genomico di siti di restrizione avvalendosi della PCR e può essere applicata su ogni tipo di DNA, dal più complesso al più semplice (Fig. 7). L'ottenimento di un *fingerprinting* non necessita quindi di una precedente conoscenza delle sequenze da amplificare ed utilizza un set limitato di *primer* generici. Il numero di frammenti ottenibili può essere modificato semplicemente variando il set di *primer* utilizzati. La riproducibilità e affidabilità di tale tecnica è legata al fatto che i protocolli prevedono condizioni di reazione molto stringenti per l'*annealing* dei *primer*, contrariamente alle RAPD dove le temperature di *annealing* sono sempre molto basse.

Nello specifico la tecnica prevede la restrizione del materiale genetico utilizzando due enzimi; uno che applica tagli frequenti all'interno del genoma (*MseI*, sito di riconoscimento 4bp) e uno che applica tagli poco frequenti (*EcoRI*, sito di riconoscimento 6bp). Successivamente vengono 'legati' ai frammenti generati degli adattatori specifici per i siti di restrizione. I ristretti/legati vengono poi sottoposti ad una PCR preselettiva che utilizza *primer* specifici per

gli adattatori con l'aggiunta di una base preselettiva (in genere Adenina per Eco e Citosina per Mse), tale *step* permette di selezionare un sottogruppo di frammenti che verranno amplificati. Il prodotto ottenuto viene poi sottoposto ad una successiva PCR selettiva che utilizza *primer* specifici per EcoA e MseC con l'aggiunta di due basi selettive per ogni *primer*; le basi selettive possono essere variate. Tale fase di amplificazione permette di ottenere un gruppo di frammenti che potranno essere osservati ed analizzati tramite corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide. Il risultato della corsa elettroforetica fornirà il *fingerprinting* molecolare dei campioni sottoposti ad AFLP.

Tramite questa tecnica è possibile andare ad individuare polimorfismi presenti all'interno del genoma (variazioni nella lunghezza del frammento di restrizione, assenza del frammento).

In questo modo è possibile andare a confrontare vari DNA *fingerprinting* provenienti da individui differenti e determinarne quindi i gradi di parentela, la natura ibrida o la vicinanza filogenetica.

Tale determinazione viene fatta mediante lo '*scoring*' delle bande (verifica della presenza-assenza di una banda nel profilo elettroforetico).

I polimorfismi osservabili sono tuttavia di natura mono-allelica, non è quindi possibile stabilire se la mutazione sia a carico di uno solo o di entrambi gli alleli, anche se in linea generale tale aspetto potrebbe essere determinato andando ad osservare l'intensità della banda.

Un profilo elettroforetico in genere contiene dalle 50 alle 100 bande e può essere analizzato manualmente tramite colorazione del gel con reagenti chimici (es. *Silver Staining*) o automaticamente avvalendosi di un apparato per il sequenziamento automatico.

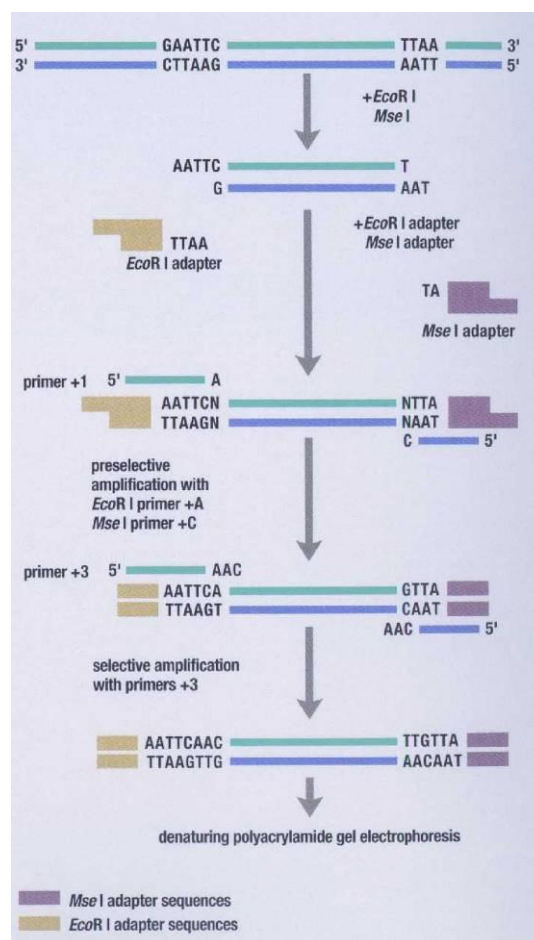


Figura 7 - Rappresentazione schematica della procedura di marcatura molecolare AFLP

I marcatori molecolari in Limonium sp.

Esistono svariati esempi di applicazione di marcatori molecolari al *Limonium* sia con lo scopo di stabilire le parentele di ibridi spontanei e non, sia per stabilire i rapporti filogenetici intra- ed inter-specifici.

La disponibilità informazioni relative all'uso di marcatori molecolari in *Limonium* è dovuta in primo luogo al fatto che, in particolar modo nel bacino mediterraneo, tale pianta rappresenta un notevole patrimonio di biodiversità.

I marcatori molecolari hanno permesso di chiarire molti dei dubbi relativi alla classificazione tassonomica del genere; è stato infatti possibile tramite l'uso dei RAPD classificare come sinonime le specie *L. caspia*, *L. otolepis* ed *L. bellidifolium* (Bruna *et al.*, 2004). Tale tipo di marcatore si è inoltre rivelato utile nella determinazione della natura ibrida di alcune cultivar commerciali stabilendo le linee parentali di appartenenza (Bruna *et al.*, 2005).

Data la natura spesso poliploide del genoma di molte specie di *Limonium* l'uso di marcatori codominanti ed a singolo locus come gli SSR si è dimostrato utile al fine di approfondire gli aspetti evolutivi di alcune "microspecie". Lo sviluppo di sequenze microsatelliti su specie endemiche spagnole di *L. narbonense* (Palop *et al.*, 2000) ha permesso di valutare la capacità di applicazione di tale tecnica anche su altre specie di *Limonium* (Palop *et al.*, 2002), Teani *et al.*, 2010), abbattendo quindi i costi e tempi lunghi necessari della realizzazione di librerie genomiche.

Un interessante studio a supporto dell'uso dei marcatori AFLP in *Limonium* a scopi filogenetici è quello di Palacios *et al.* (1999). Lo scopo del lavoro è stato quello di applicare la tecnica AFLP ad una popolazione autoctona di *Limonium* e valutare l'efficienza di tale tecnica comparandola a marcatori più tradizionali quali i RAPD. Il risultato di tale lavoro ha portato ad interessanti conclusioni per quanto riguarda l'applicabilità ed informatività della tecnica, confermando come l'alta riproducibilità sia il punto di forza di tali marcatori molecolari, soprattutto in contesti di conservazione del germoplasma *ex situ*, dove si richiede una valutazione efficiente e costante nel tempo delle caratteristiche genetiche del materiale conservato.

SCOPO DEL LAVORO

Il progetto di questo dottorato ha avuto come scopo la caratterizzazione di una collezione di *Limonium* presente presso il CRA-VIV di Pescia e si è concentrato in particolar modo sulle principali specie in conservazione nell'ambito del progetto RGV-FAO.

In primo luogo si è proceduto alla caratterizzazione dei diversi genotipi su base morfometrica andando ad individuare le accessioni maggiormente affini alle specie botaniche di riferimento. Successivamente si è proceduto alla loro caratterizzazione molecolare mediante marcatori AFLP, con lo scopo di ottenere i *fingerprinting* degli individui in esame che sono stati poi confrontati ed elaborati statisticamente al fine di ottenere un albero filogenetico.

La messa a punto dei protocolli, aspetto di grande importanza in questo progetto, si è svolta presso i laboratori del CRA VIV di Pescia.

Tale lavoro si è inoltre concentrato sulla possibilità di confronto fra i dati ottenuti coi marcatori biometrici e quelli ottenuti coi marcatori molecolari.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

MATERIALE VEGETALE

Le piante oggetto di studio sono conservate e coltivate in bancali a terra nelle serre sperimentali del CRA-VIV. Gran parte del materiale era già presente nella collezione, trattandosi di specie perenni (Tab. 1).

Per quanto riguarda il nuovo materiale reperito durante i tre anni di lavoro, i semi sono stati acquistati presso la B&T seed company, oppure reperiti presso altre collezioni (Tab. 1).

Al fine di mantenere i genotipi della collezione, o anche per favorire l'ottenimento di nuovi ibridi spontanei (rispettivamente per autofecondazione o impollinazione libera), ogni 2-3 anni i semi vengono raccolti dalle piante madri e conservati o seminati. I semi vengono posti in vassoi di polistirolo contenenti terriccio universale e ricoperti con perlite. Una volta germinate, le plantule di un mese di età vengono trasferite in vasi e successivamente trapiantate in terra, in parcelle da 6-8 individui per specie.

Per l'esecuzione dei rilievi biometrici, questi sono stati effettuati nel secondo anno successivo al trapianto. Per quanto riguarda invece le analisi molecolari, l'estrazione del materiale genetico è stata effettuata su foglie giovani al momento della rimonta, dopo la cimatura della infiorescenze.

VALUTAZIONE MORFOMETICA

Raccolta dei dati

L'attività di raccolta e catalogazione dei dati morfometrici è stata effettuata su piante adulte in piena fioritura ed ha interessato un massimo di sei individui per ogni specie (se disponibili). Sui valori ottenuti dai rilievi sono state fatte le medie ed i risultati ottenuti sono stati convertiti in scale numeriche per rendere più semplice l'elaborazione statistica.

Sono stati scelti nove parametri morfometrici, tra 37 riportati in Fig. 4, ai fini dell'elaborazione statistica: sei di natura quantitativa e tre di natura qualitativa (Tab. 2).

I dati sono stati confrontati fra specie al fine di ottenere una matrice di similitudine, sono stati quindi contati i parametri comuni facendo un controllo incrociato specie per specie.

La matrice è stata immessa nel programma di elaborazione statistica "R" ed è stata eseguita una *cluster analysis* utilizzando il pacchetto "RCommander".

Tabella 2 - Elenco dei dati morfometrici raccolti, con la lettera L sono contrassegnati i dati di natura quantitativa, con la lettera Q i dati di natura qualitativa. I tipi di infiorescenza si riferiscono a quelli riportati in Fig. 5

L1	Altezza pianta (1=bassa; 2=alta)
L3	Lunghezza foglia (1=corta; 2=lunga)
L5	Lobatura fogliare (0=assente; 1=presente)
L7	Stelo con foglie (0=assente; 1=presente)
L10	Alatura peduncolo (0=assente; 1=presente)
L13	Dimensione corolla (1=piccola; 2=media; 3=grande)
Q2	Tipo infiorescenza (1= tipo I; 2= tipo II; 3= tipo III; 4= tipo IV; 5= tipo V; 6= tipo VI)
Q3	Tipo calice (1= campanulato; 2= a imbuto; 3= a campana aperta)
Q5	Colore corolla (1= bianco; 2= giallo; 3= rosa – rosso; 4= blu-viola)

VALUTAZIONE MOLECOLARE

Estrazione del materiale genetico (DNA) con protocollo DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

- Prelevare dalla pianta 100 mg circa di foglie giovani e porle all'interno di provette da 2 ml aggiungendo due sfere in tungsteno.
- Omogenizzare i campioni per 30 sec. utilizzando il Tissue Lyser (QIAGEN).
- Aggiungere 400 µl di Buffer AP1 (preriscaldato a 65°C se precipitato)
- Aggiungere 4 µl di RNasi (100mg/ml, fornita dal kit) e porre i campioni a 65°C per 10' (mescolare 2-3 volte capovolgendoli durante l'incubazione).
- Aggiungere 130 µl di Buffer AP2 e incubare 5' in ghiaccio, centrifugare per 30' a 4°C, 10000 rpm.
- Recuperare il surnatante e metterlo nelle colonnine viola; fare una centrifuga del residuo rimasto di 5' alla max velocità e recuperare il surnatante.
- Centrifugare le colonnine viola per 2' alla max velocità; recuperare il filtrato e metterlo in una eppendorf misurando il suo volume.
- Aggiungere 1,5 volumi di buffer AP3.
- Porre il contenuto dell'eppendorf (in due step) nelle colonnine bianche e centrifugare per 1' a 8300 rpm, scartare il filtrato e ripetere con il resto del campione.
- Spostare la colonnina in un nuovo tubo ed aggiungere 500 µl di buffer AW, centrifugare per 1' a 8300 rpm, scartare il filtrato.
- Aggiungere altri 500 µl di buffer AW, centrifugare per 2' a 12000 rpm, buttare il filtrato e il tubo conservano la colonnina.
- Trasferire la colonnina in un tubo eppendorf da 1,5 ml ed aggiungere 100 µl di buffer AE (preriscaldato a 65°C) direttamente sulla membrana. Incubare 5' a temperatura ambiente e centrifugare 1' A 8300 rpm.
- Ripetere lo step trasferendo la colonnina in un secondo tubo eppendorf.

Il materiale estratto è stato valutato tramite corsa elettroforetica per determinare eventuali contaminazioni di RNA, la quantificazione è stata poi condotta tramite spettrofotometro per determinare il grado di purezza del materiale (A_{260}/A_{280}) e tramite fluorometro (Qubit Fluorometer, Invitrogen) al fine di ottenere una stima il più possibile esatta della quantità di DNA estratto .

Restrizione- Ligazione (RL) con enzimi EcoRI e MseI

Questi sono i primi due step della procedura di marcatura molecolare AFLP. A restrizione sono stati sottoposti 100 ng di DNA (10 µl).

Mix di reazione (v. totale 20 µl)

1. H₂O q.b a volume totale
2. NE Buffer 4 (NewEngland Biolabs) 1X 2 µl
3. BSA (NewEngland Biolabs) 100X 0.2 µl
4. EcoRI (NewEngland Biolabs) 5U 0.12 µl
5. MseI (NewEngland Biolabs) 5U 0.25 µl

Incubazione 3h a 37°C.

Preparazione Adattatori Eco/Mse

Durante l'incubazione si preparano gli adattori Eco/Mse per la ligazione

- Sospensione STOCK 100 µM: i primers liofilizzati vengono sottoposti a spin in centrifuga e portati alla concentrazione stock aggiungendo H₂O (Dnase,Rnase free), pipettare e vortexare il tubo per sciogliere il primer .

Primer con sequenza	nmoli	H ₂ O
MseA1 5'- GAC GAT GAG TCC TGA G-3'	41.7	417
MseA2 5'- TAC TCA GGA CTC AT-3'	56.7	567
EcoA1 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	41.7	417
EcoA2 5'- AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'	34.5	345

	µM	µl STOCK	H ₂ O
MseA1	25	50	100
MseA2	25	50	
EcoA1	2.5	5	190
EcoA2	2.5	5	

- Annealing, 3' a 95° + t.amb. 2h: in due tubi diversi per MseA e EcoA (V. Tot 200ul)

Ligazione (volume totale 20 µl)

- H₂O 7 µl
- T4 Buffer 1X 4 µl
- EcoR1 A 10 pmoli 4 µl
- MseI A 100 pmoli 4 µl
- T4DNA Ligasi 4U/µl 1ul

La miscela di ligazione viene aggiunta ai campioni ristretti e lasciata incubare *overnight* a 16°C.

Preamplificazione (PA)

I campioni RL vengono diluiti 1/5 con H₂O.

Sequenze primer:

EcoPriA 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'

MsePriC 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'

I primer liofilizzati sono stati diluiti con H₂O alla concentrazione stock di 100 µM

Mix di preamplificazione (Qiagen, TopTaq Master Mix):

- H₂O 19,3 µl
- EcoPriA 50 ng/µl 0,9 µl
- MsePriC 50 ng/µl 0,9 µl
- Top Taq Master Mix 2X 12,5 µl
- Templato DNA 5 µl (c.a 50ng)

Programma di preamplificazione:

- 94°C x 1'

25 cicli:

- 94°C x 30''
- 56°C x 30''
- 72°C x 1'

Al termine dell'amplificazione, 8 µl di ogni campione vengono sottoposti ad elettroforesi di controllo in gel di agarosio 2%.

Amplificazione AFLP

Il DNA prodotto di Preamplificazione viene diluito 1/20 con H₂O.

Sequenze dei primer:

<i>ECOACT</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C ACT-3'
<i>ECOACA</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3'
<i>ECO AAC</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3'
<i>ECOACC</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C ACC-3'
<i>ECOAGC</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C AGC-3'
<i>ECOAAG</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C AAG-3'
<i>ECOAGG</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C AGG-3'
<i>ECOACG</i>	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C ACG-3'
<i>MSECAA</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAA-3'
<i>MSECAC</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAC-3'
<i>MSECAG</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAG-3'
<i>MSECAT</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CAT-3'
<i>MSECTA</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTA-3'
<i>MSECTC</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTC-3'
<i>MSECTG</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTG-3'
<i>MSECTT</i>	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A CTT-3'

I primer liofilizzati sono stati diluiti con H₂O alla concentrazione stock di 100 µM

Mix di amplificazione:

- H₂O 19,3 µl
- EcoPriA 50 ng/µl 0,9 µl
- MsePriC 50 ng/µl 0,9 µl
- Top Taq Master Mix 2X 12,5 µl
- Templato DNA 5 µl

Il programma di PCR è il seguente:

- 90°C x 1'

13 cicli:

- 90°C x 30''
- 65°C > 56,6°C (-0,7 ogni ciclo) x 30''
- 72°C x 1'

23 cicli:

- 90°C x 30''
- 56°C x 30''
- 72°C x 1'

Al termine dell'amplificazione, 8 µl di ogni campione vengono sottoposti ad elettroforesi di controllo in gel di agarosio 2%

Una volta verificata l'avvenuta amplificazione, è possibile procedere alla corsa elettroforetica verticale in gel di poliacrilammide utilizzando un apparato elettroforetico da sequenziamento (Seqi-Gen GT System, BioRad)

Allestimento della corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide

Trattamento vetri:

I vetri, adeguatamente puliti ed asciutti vengono trattati nel seguente modo:

Trattamento vetro libero (sul quale resterà adeso il gel):

Preparare la *Binding solution* aggiungendo 4,5 µl di *Bind Silane* (Promega) a 1,5 ml di soluzione composta da 1,33 ml di etanolo + 700 µl di acido acetico + H₂O fino a 1,5 ml.

- 1) Prelevare con la pipetta 750 µl di *Bind. Sol.* e distribuirli sul vetro, quindi utilizzare una salvietta per uniformare il prodotto su tutta la superficie. Attendere 5' che il prodotto si sia asciugato.
- 2) Ripetere lo step 1 con i restanti 750 µl di *Bind. Sol.*
- 3) Passare sulla superficie del vetro una salvietta imbevuta di etanolo al 70% per rimuovere gli eccessi di prodotto.

Trattamento IPC (vetro composto):

La soluzione *Repeal Silane* (GE Healthcare) è già pronta per l'uso. Per effettuare il trattamento seguire gli stessi step effettuati durante il trattamento del vetro libero.

Qualora i vetri vengano contaminati è necessario immergerli in una soluzione di NaOH al 10% per circa 30-60 min.

Assemblaggio vetri e preparazione del gel di poliacrilammide

Tracciare una riga con un pennarello da vetreria a 3,5 cm dal bordo alto del vetro libero (sarà la guida per l'inserimento del pettine).

Appoggiare gli spaziatori ai lati dell'IPC e porre sopra il vetro libero facendo combaciare i bordi.

Chiudere i due vetri con i morsetti neri ed applicare sul fondo il vassoio sigillante.

Porre i vetri in posizione orizzontale, con l'IPC rivolto verso l'alto, rialzando l'estremità alta di 3 cm circa.

Preparazione del gel (100 ml di soluzione):

In un beaker da 100 ml posto su un agitatore magnetico riscaldante aggiungere:

- Acrilammide, soluzione a 40%, 12 ml
- Bisacrilammide, soluzione al 2%, 12,5 ml
- TEMED 100ul
- APS, soluzione al 10%, 250 μ l
- Portare a volume con TBE1X + Urea 7M

Versare la soluzione nell'apposita siringa ed inserire il tubicino di gomma nel foro posto al di sotto del vassoio sigillante.

Immettere la soluzione premendo sul pistone in maniera decisa e costante prestando attenzione affinché il fronte di corsa sia omogeneo e non si formino bolle. Continuare ad immettere la soluzione fino a che la soluzione non fuoriesce dall'intercapedine superiore.

Inserire il pettine dal lato liscio facendolo scivolare fra i due vetri.

Una volta completata l'immissione appoggiare la siringa sopra l'IPC, non togliere il tubicino dal foro fino a che il gel non si sarà completamente solidificato (1h circa).

Corsa Elettroforetica:

Liberare i vetri dal vassoio sigillante e assemblarli nell'apparato elettroforetico, rimuovere il pettine.

Versare circa 300 ml di TBE 1X nella vasca bassa dell'apparato, e circa 1,5 L di soluzione nel serbatoio dell'IPC (fino a raggiungere 2 cm circa dal bordo alto del serbatoio).

Pulire il fronte di corsa dall'urea e dai residui di poliacrilammide usando una pipetta da 1ml.

Precorrere a 70w per riscaldare il gel.

Inserire il pettine dalla parte dei denti, facendolo penetrare sul pelo del fronte di corsa per creare i pozzetti.

Caricare i campioni (4,5 μ l) precedentemente preparati in questo modo:

Aggiungere 14 μ l di BluAFLP e denaturare i campioni a 95°C per 5', porre in ghiaccio.

Far correre per 2h a 70w, a 50°C.

Svuotare i serbatoi, smontare i vetri e separarli con attenzione stando attenti che il gel resti completamente adeso al vetro libero, procedere con la colorazione *Silver Staining* (Promega).

Colorazione Silver Staining

- FIX/STOP Solution: 200 ml Acido Acetico + 1800 ml UPW (acqua ultrapura)
- STAINING SOLUTION: 2 g Silver nitrate + 3 ml Formaldeide 37% + 2000 ml UPW
- DEVELOPING SOLUTION: 60 g ACS reagent + 2000 ml UPW. Raffreddare fino a 10° e completare al momento dell'uso con 3 ml Formaldeide 37% + 400 µl Tiosolfato di sodio .
- Nella cappa chimica mettere in agitazione per 30' il vetro in una vasca riempita con 2 L di soluzione Fix/Stop, recuperare poi la soluzione e metterla a 4°.
- Trasferire il vetro in una vasca riempita con 2L di UPW e tenerlo in agitazione per 5'. Ripetere l'operazione trasferendo il vetro in una nuova vasca.
- Trasferire il vetro in una vasca riempita con Staining soluzione posta sotto cappa chimica. Far colorare in agitazione per 30'. Quando mancano 15' controllare la temperatura della Developing Solution e completarla aggiungendo formaldeide e tiosolfato. Togliere il vetro, svuotare la soluzione in un contenitore di recupero, sciacquare la vasca e riempirla con UPW.
- Dividere la Dev. Sol. In due vasche. Sciacquare velocemente (4'') il vetro nella vasca riempita con UPW e passarlo nella vasca con Dev. sol agitando manualmente fino a far apparire le prime bande.
- Trasferire il vetro nella vasca seconda vasca con Dev. Sol. e togliere quando il gel inizia ad imbrunire, 2-3'. Fermare la reazione versando nella vasca 1L di Fix/Stop.
- Sciacquare il vetro per 2' in una vasca riempita con UPW.
- Asciugare il gel in posizione quasi verticale.

Una volta asciutto si può procedere all'acquisizione del vetro tramite scansione.

Sulle coppie polimorfiche sono state effettuate corse elettroforetiche in gel di poliacrilammide sottoposte poi a *scoring* delle bande.

Lo scoring è stato effettuato con l'ausilio di un pacchetto software in grado di assistere l'operatore nel rilevamento della presenza/assenza di bande sul gel. Il software utilizzato è stato "Cross checker"

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

MARCATORI MORFOMETRICI

La scelta dei parametri morfometrici per effettuare l'analisi filogenetica ha interessato i descrittori maggiormente rappresentativi ed informativi in relazione alle specie in esame.

Gli aspetti relativi alle dimensioni della pianta (altezza L1 e lunghezza della foglia L3) sono stati scelti per meglio discriminare le specie di dimensioni ridotte (*L. gougetianum*, *L. binervosum*, *L. tataricum*). La presenza di lobatura fogliare (L5) rappresenta un aspetto fondamentale nell'identificazione di specie come *L. bonduelli*, *L. sinuatum*, *L. suworovii*. La presenza di foglie sullo stelo (L7) identifica in maniera esatta *L. otolepis* e *L. perezii*, mentre la presenza di alatura sul peduncolo (L10) caratterizza *L. bonduelli*, *L. sinuatum* ed *L. perezii*. Altro aspetto discriminante è la dimensione della corolla (L13), che si presenta di grandi dimensioni solo in *L. sinuatum* e *L. virgatum*.

Uno degli aspetti morfologici più interessanti è poi la tipologia di infiorescenza (Q2) che risulta peculiare nel caso di *L. tataricum* (tipo1) e nel caso di *L. suworovii* (tipo 6). E' inoltre caratteristico anche il tipo di calice (Q3), che solo per *L. tataricum* ed *L. suworovii* è del tipo 1. Il colore della corolla infine è in grado di dividere la collezione in tre gruppi: gruppo 1 (bianco), che comprende le specie *L. tataricum*, *L. sinuatum* e *L. perezii*; gruppo 2 (giallo), in cui si identificano *L. aureum*, *L. bonduelli* e *L. sinensis*; gruppo 4, che comprende il resto delle specie con colore della corolla che va dal blu/violetto al viola chiaro (Tab. 3).

Tabella 3 - Elenco dei valori morfometrici raccolti per le varie specie in esame

Sample	L1	L3	L5	L7	L10	L13	Q2	Q3	Q5
BOND	2	2	1	0	1	2	2	2	2
GME	2	2	0	0	0	1	4	1	4
BIN	1	1	0	0	0	2	5	1	4
LAT	2	2	0	0	0	2	4	1	4
DENS	2	1	0	0	0	2	5	1	4
GOU	1	1	0	0	0	1	5	1	4
AUR	2	1	0	0	0	2	4	2	2
OTO	2	1	0	1	0	1	5	1	4
SINE	2	2	0	0	0	2	4	2	2
SINU	2	2	1	0	1	3	2	2	1
TATA	1	1	0	0	0	2	1	3	1
SUWO	2	2	1	0	0	1	6	3	3
PERE	2	2	0	1	1	2	3	2	1
SER	2	2	0	0	0	2	4	1	4
VIRG	2	1	0	0	0	3	5	1	4

Tabella 4 - Matrice di similitudine che illustra il numero di caratteri morfometrici in comune fra ogni coppia di specie esaminata.

	BOND	GME	BIN	LAT	DENS	GOU	AUR	OTO	SINE	SINU	TATA	SUW	PERE	SER	VIRG
BOND	9	3	4	4	3	1	5	1	6	7	2	4	5	4	2
GME	3	9	5	8	6	6	5	6	6	3	3	5	3	8	6
BIN	4	5	9	6	7	8	5	5	4	1	6	2	2	6	6
LAT	4	8	6	9	7	5	6	5	7	3	4	4	4	9	6
DENS	3	6	7	7	9	7	6	7	5	2	5	3	3	7	8
GOU	1	6	8	5	7	9	4	7	3	1	5	3	1	5	7
AUR	5	5	5	6	6	4	9	4	8	3	5	3	4	6	5
OTO	1	6	5	5	7	7	4	9	3	1	3	3	3	5	7
SINE	6	6	4	7	5	3	8	3	9	4	4	4	5	7	4
SINU	7	3	1	3	2	1	3	1	4	9	2	4	5	3	3
TATA	2	3	6	4	5	5	5	3	4	2	9	3	3	4	4
SUW	4	5	2	4	3	3	3	3	4	4	3	9	2	4	3
PERE	5	3	2	4	3	1	4	3	5	5	3	2	9	4	2
SER	4	8	6	9	7	5	6	5	7	3	4	4	4	9	6
VIRG	2	6	6	6	8	7	5	7	4	3	4	3	2	6	9

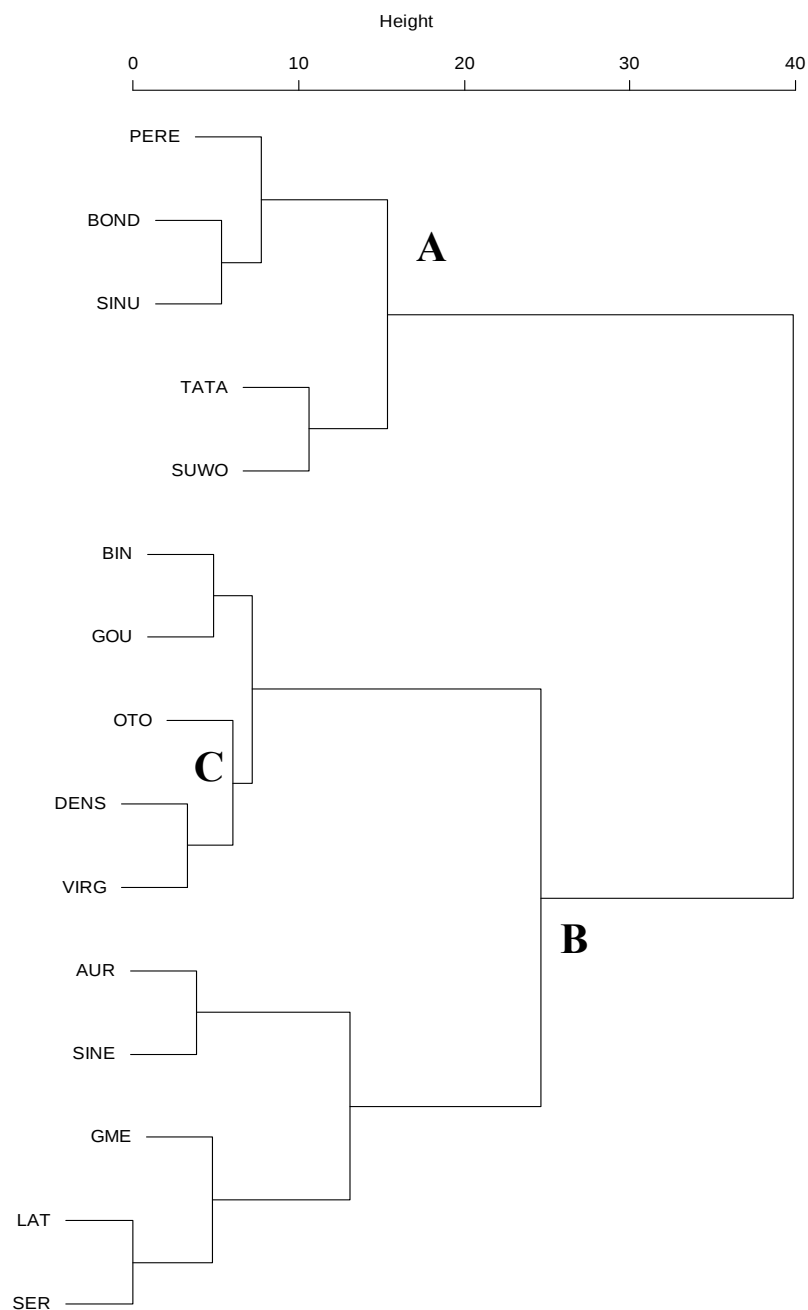


Figura 8 Dendrogramma dei dati morfometrici. Metodo=Ward; Distanza=Euclidea

Il dendrogramma (Fig. 8), ottenuto tramite elaborazione statistica della matrice di similitudine (Tab. 4), identifica due gruppi distinti, A e B, fornendo una prima panoramica sulla distribuzione delle specie in esame.

La collocazione isolata nel gruppo di *L. perezii* è chiarita dal fatto che tale specie è l'unica rappresentante nella collezione del sottogenere *Verilimonium* (sottosez. *Nobiles*) ed ha un areale di provenienza identificato nelle Isole Canarie.

E' giustificabile inoltre, sempre in A, la presenza del sottogruppo *L. sinuatum/L. bonduelli* poiché entrambe le specie appartengono alla sottosezione *Odontolepidae* e sono interfeconde. Non è invece chiara la presenza del sottogruppo *L. tataricum/L. suworovii*: tali specie infatti appartengono a due sottogeneri completamente diversi, la prima a *Goniolimon*, la seconda a *Siphonanta*.

Nel gruppo B invece vengono raccolte le specie di provenienza prevalentemente europea e orientale.

L. binervosum e *L. gougetianum* sono entrambi compresi nella sottosezione *Densiflorae*. Il raggruppamento di *L. virgatum* e *L. densissimum* è spigato dalla similitudine morfologica esistente tra le due specie.

Comprensibile è anche la presenza di *L. aureum* e *L. sinensis* nello stesso sottogruppo essendo anche queste due specie interfeconde.

Infine il raggruppamento *L. gmelini*, *L. latifolium* e *L. serotinum* risulta chiaro data l'appartenenza di tali specie alla sezione *Eulimonium*.

Non è invece chiara la presenza di *L. otolepis* in C, data la sua interfecondità con le specie della sezione *Eulimonium*.

MARCATORI MOLECOLARI

Estrazione del materiale genetico

La fase di estrazione del materiale genetico rappresenta uno degli aspetti fondamentali per la buona resa della tecnica AFLP (Fig. 9). Infatti materiale di scarsa qualità può portare ad artefatti e restrizioni parziali generando profili di fingerprinting falsati.

Questo aspetto ha fatto sì che una buona parte del lavoro di messa a punto si concentrasse sulla fase di estrazione del DNA con lo scopo di ottenere campioni di buona qualità.

Ciò tuttavia non è stato semplice poiché il materiale vegetale di partenza è risultato estremamente eterogeneo (Fig. 10), sia dal punto di vista delle dimensioni che da punto di vista della consistenza fogliare. Per questo motivo le rese quantitative non sono state sempre ottimali (Tab. 5). Inoltre, come si può facilmente dedurre dai rapporti di assorbanza ottenuti (Tab. 6), il materiale risulta contaminato da proteine nonostante il kit utilizzato preveda un passaggio di purificazione apposito tramite colonnine QIAshredder. Per questo motivo è stato necessario intervenire sulle successive fasi del protocollo al fine di mantenere quantità di campioni ottimali e ridurre al minimo i rischi di artefatto legato alla presenza di contaminanti durante la fase di restrizione/ligazione.

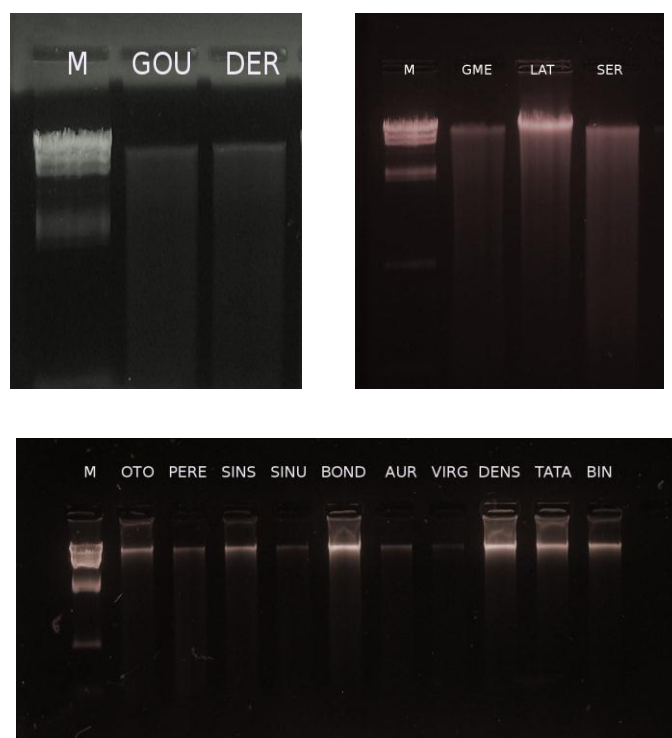


Figura 9 - Corsa elettroforetica in gel di agarosio 0,7% dei campioni di DNA genomico. M: λ (QIAGEN)

Tabella 5 - Valori quantitativi di DNA ottenuti tramite misurazione con Fluorometro

Campione	ng/ul
1. GME	31,00
2. LAT	44,20
3. OTO	8,72
4. SINS	32,60
5. TATA	185,00
6. SINU	48,20
7. SER	84,30
8. PERE	5,93
9. BOND	17,20
10. DER	111,00
11. GOU	1,53
12. BIN	204,00
13. VIRG	8,52
14. DENS	3,76
15. AUR	32,50

Tabella 6 - Indice di purezza del DNA stimato tramite misurazione allo spettrofotometro

Campione	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1. GME	1,0981
2. LAT	1,1086
3. OTO	1,1394
4. SINS	1,0121
5. TATA	1,0070
6. SINU	0,9067
7. SER	1,7384
8. PERE	1,0672
9. BOND	0,9936
10. DER	1,0726
11. GOU	1,0196
12. BIN	0,9049
13. VIRG	0,4256
14. DENS	1,0237
15. AUR	0,9767

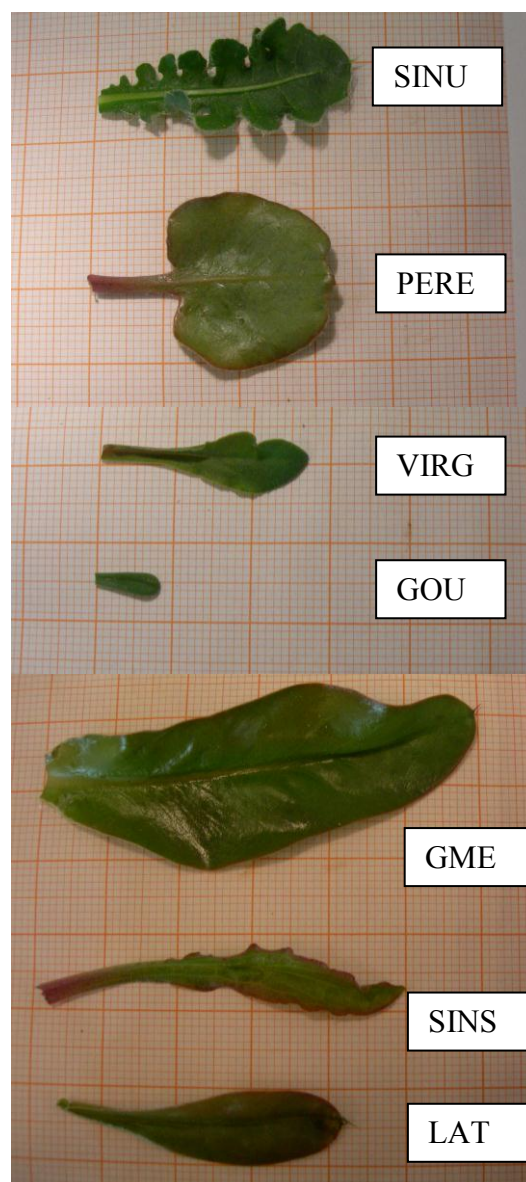


Figura 10 - Panoramica esemplificativa delle difformità in termini di caratteristiche e dimensioni fra le foglie giovani di alcune delle specie in esame.

Non è stato possibile sottoporre ad indagine molecolare *L. suworovii* poichè l'estrazione del materiale genetico della prima generazione di piante non ha dato risultati positivi mentre i semi della seconda generazione (prodotti per autofecondazione) non sono risultati vitali.

Al posto di *L. suworovii* si è deciso di sottoporre quindi ad indagine molecolare un'accessione di *L. deracifolium*, considerata nell'indagine morfometrica come sinonima di *L. binervosum*, al fine di chiarire tale aspetto.

Restrizione/Ligazione

Dovendo partire con 100 ng di DNA, il protocollo di restrizione è stato modificato per ottenere la massima efficienza da parte degli enzimi di restrizione. Le quantità di enzimi sono state quindi dimezzate rispetto al protocollo originale (da 5U a 2,5U per entrambi gli enzimi). Il protocollo di ligazione invece non ha subito alcuna variazione.

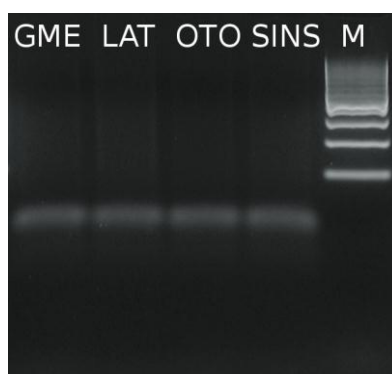


Figura 11 - Esempio di R/L su alcune delle specie in esame. M: 100bp (Fermentas). Gel agarosio 2%.

Il profilo elettroforetico evidenzia una banda a basso peso molecolare che dovrebbe rappresentare i frammenti generati nella fase di restrizione (Fig. 11).

Per quanto riguarda la diluizione, si è deciso di mantenere più concentrati i campioni per poter disporre di una quantità ottimale di ristretto/legato da sottoporre a preamplificazione. La diluizione è stata quindi portata da 1:10 (diluizione fissata dal protocollo di riferimento) a 1:5.

Preamplificazione

La preamplificazione è stata condotta utilizzando una master mix invece di una Taq polimerasi con reagenti separati (Fig. 12). Sono state fatte prove utilizzando entrambi i kit e si è osservato che non vi era alcuna variazione significativa tra i due saggi, per cui la scelta è ricaduta sulla master mix sia per motivi economici sia per il fatto che, non disponendo di una micropipetta elettronica, l'uso di questo tipo di reagente riduce il rischio di errore legato a un alto numero di passaggi con la micropipetta meccanica.

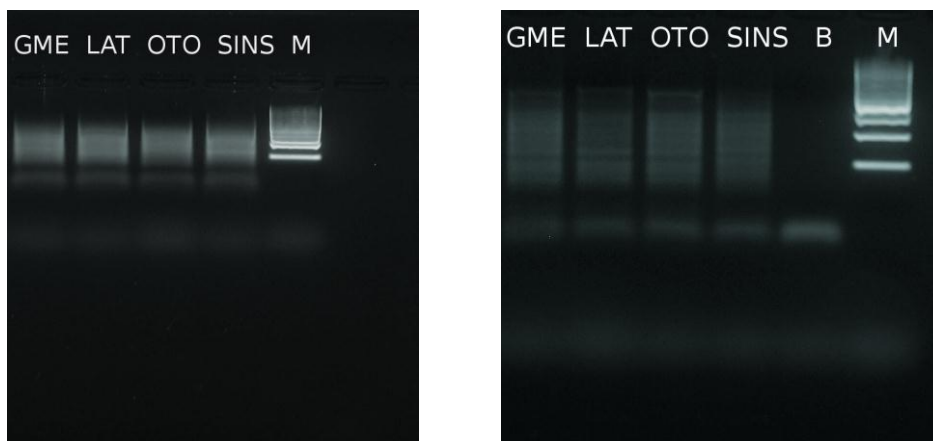


Figura 12 - Esempio di PA su alcune delle specie in esame. Confronto fra amplificazione con Top Taq polymerase (a sinistra) e Top Taq Master Mix (a sinistra). M: 100bp (Fermentas). Gel agarosio 2%

Il profilo elettroforetico rispecchia quello atteso: è chiaramente osservabile infatti uno *smear* che si aggira intorno alle 1000-100 bp.

Amplificazione

La fase di amplificazione selettiva ha previsto una serie di test per la valutazione dei primer polimorfici migliori.

Avendo a disposizione 8 primer Eco-ANN ed 8 primer Mse-CNN, è stato possibile testare 64 diverse combinazioni ed è stata quindi valutata la capacità da parte delle varie combinazioni di generare frammenti polimorfici (Tab. 7). Fra i primer testati, 4 coppie hanno dato buon esito dal punto di vista del numero di bande polimorfiche e qualità dell'amplificato (Fig. 13).

Tabella 7 - Matrice relativa all'informatività dei primer presi in esame.

<i>MSE</i>	<i>CAA</i>	<i>CAC</i>	<i>CAG</i>	<i>CAT</i>	<i>CTA</i>	<i>CTT</i>	<i>CTC</i>	<i>CTG</i>
<i>ECO</i>								
<i>ACT</i>	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO
<i>ACA</i>	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>AAC</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
<i>ACC</i>	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO
<i>AGC</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>AAG</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>ACG</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>AGG</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

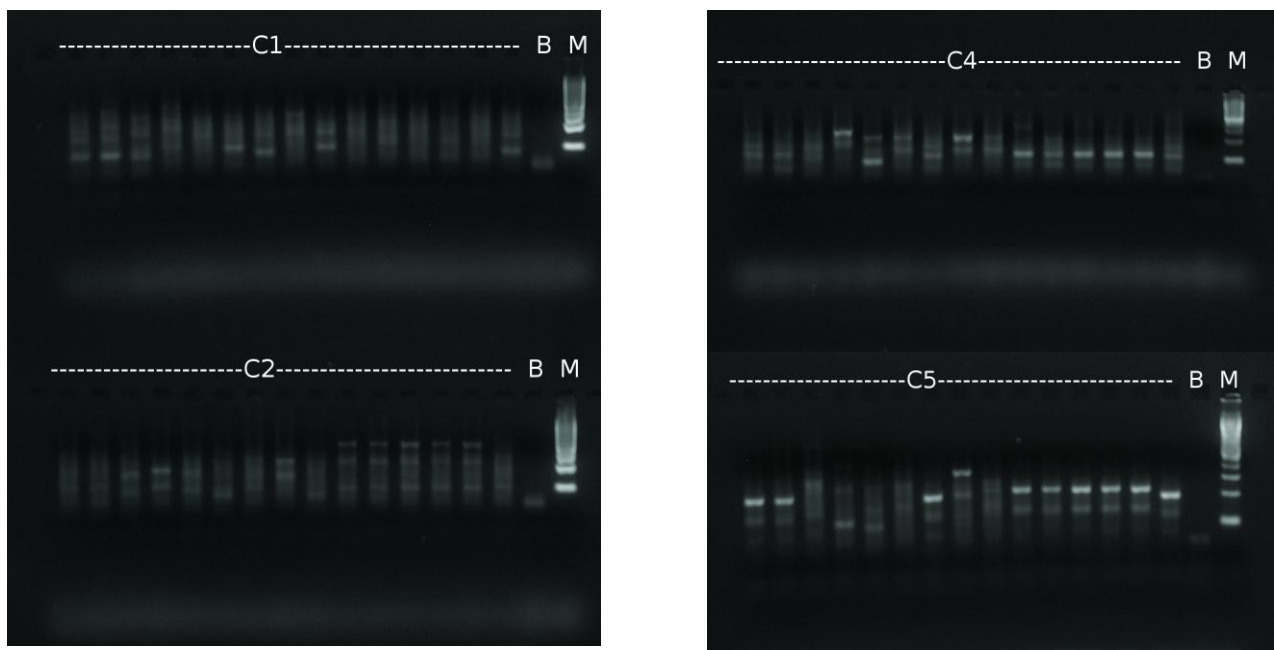


Figura 13 Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% delle 4 coppie risultate maggiormente polimorfiche ed informative: C1=E-AAC/M-CTG, C2= E-ACC/M-CTT, C4= E-ACT/M-CAT, C5=E-ACA/M-CAA. M in C1/C2: 100bp (Fermentas), M in C4/C5: 100bp (Invitrogen)

Come si può osservare dai risultati delle elettroforesi (Fig. 13), la procedura di marcatura molecolare è andata a buon fine: il pattern di bande si aggira fra 1000 bp e 100 bp e quindi si può escludere la presenza di errori legati a restrizioni parziali, possibili nel caso in cui il materiale di partenza sia di scarsa qualità.

Corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide

Attraverso il programma di *scoring* assistito è stato possibile identificare, sui quattro gel di poliacrilammide, 441 marcatori polimorfici. Lo *scoring* è stato effettuato a partire da 450 bp per le combinazioni C1, C2 (Fig. 14); da 300 bp per la combinazione C4 e da 250 bp per la combinazione C5 (Fig. 15). In ogni caso l'elevata risoluzione del gel ha permesso l'identificazione di bande polimorfiche fino a circa 15bp.

Al fine di ottenere un risultato il più possibile attendibile, la matrice binaria è stata composta accorpendo lo *scoring* di tutti e quattro i gel.

L'elaborazione statistica della matrice binaria tramite *cluster analysis* con metodo "average" ha portato all'ottenimento di un dendrogramma (Fig. 14) dove, come anche nel dendrogramma relativo ai dati morfometrici, *L. gmelini*, *L. latifolium* e *L. serotinum* vengono raggruppati in un unico cluster.

Sempre dubbia rimane la collocazione di *L. otolepis* che, in questo caso, viene inserito nel gruppo A, assieme a *L. sinensis* ed alle due specie della sottosezione *Odontolepidae*, *L. bonduelli* e *L. sinuatum*, interfeconde tra di loro e confermate nello stesso cluster, come già visto nel dendrogramma relativo ai dati morfometrici.

Il *L. tataricum* risulta inserito in un ramo isolato del gruppo B (nell'altro dendrogramma era stato collocato insieme al *L. suworovii*, assente in questa analisi).

Sempre nell'ambito del gruppo B, è possibile identificare un sottogruppo costituito da *L. gougetianum*, *L. deracifolium*, *L. virgatum*, *L. binervosum* e *L. densissimum*. Tale raggruppamento conferma l'estrema affinità fenotipica tra queste specie, anche se resta da chiarire la possibile sinonimia (supposta da alcuni autori) fra *L. deracifolium* e *L. binervosum*. Quest'ultimo infatti sembrerebbe maggiormente affine a *L. densissimum*.

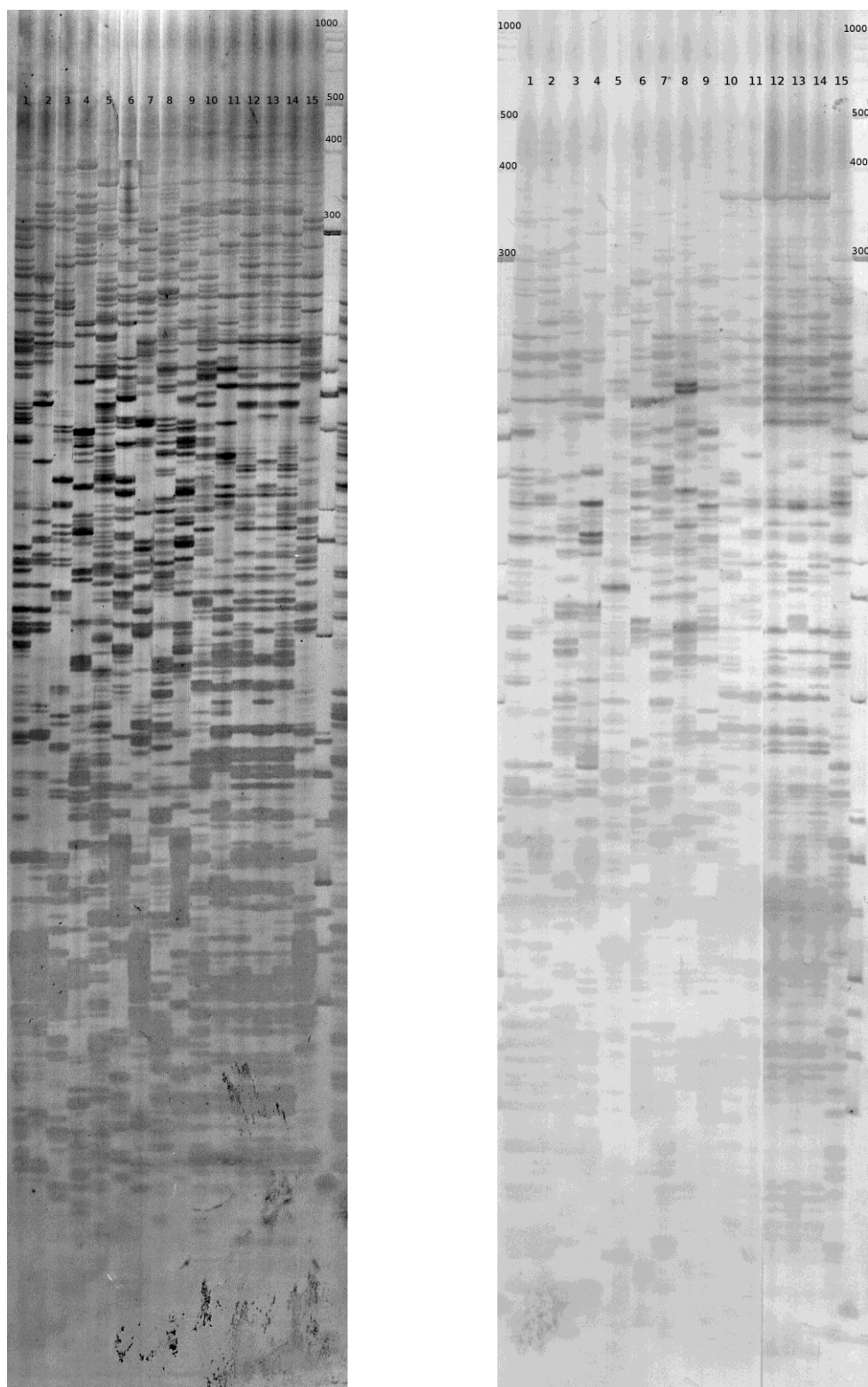


Figura 14 - Pattern elettroforetico delle combinazioni di primer C1/C2. Per il riferimento ai campioni consultare Tab. 5 e Tab. 6.

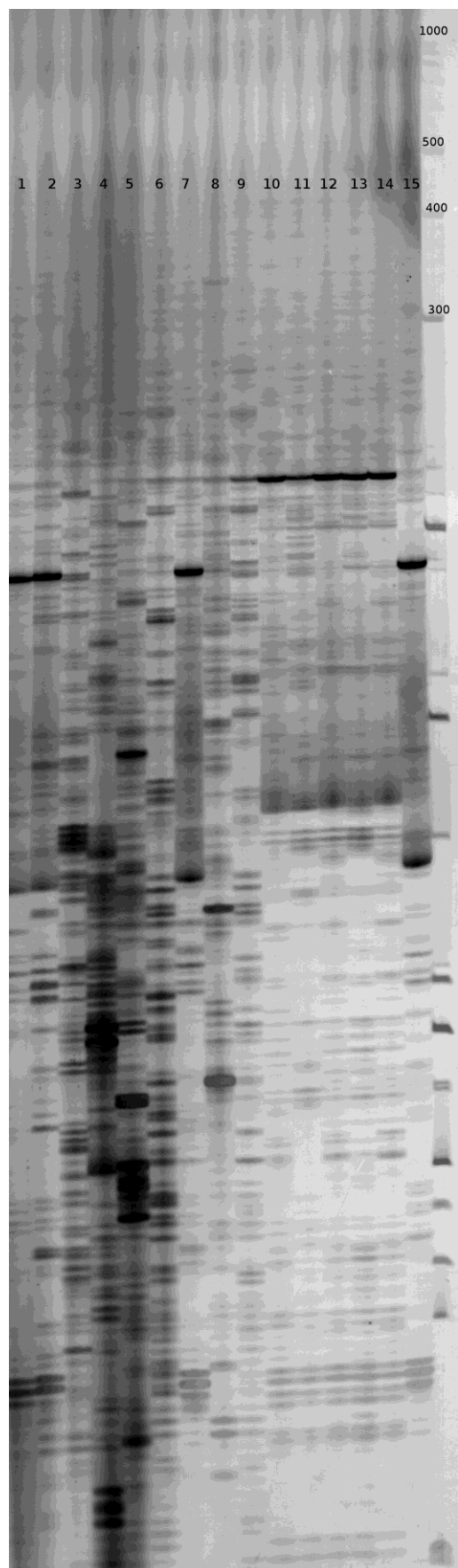
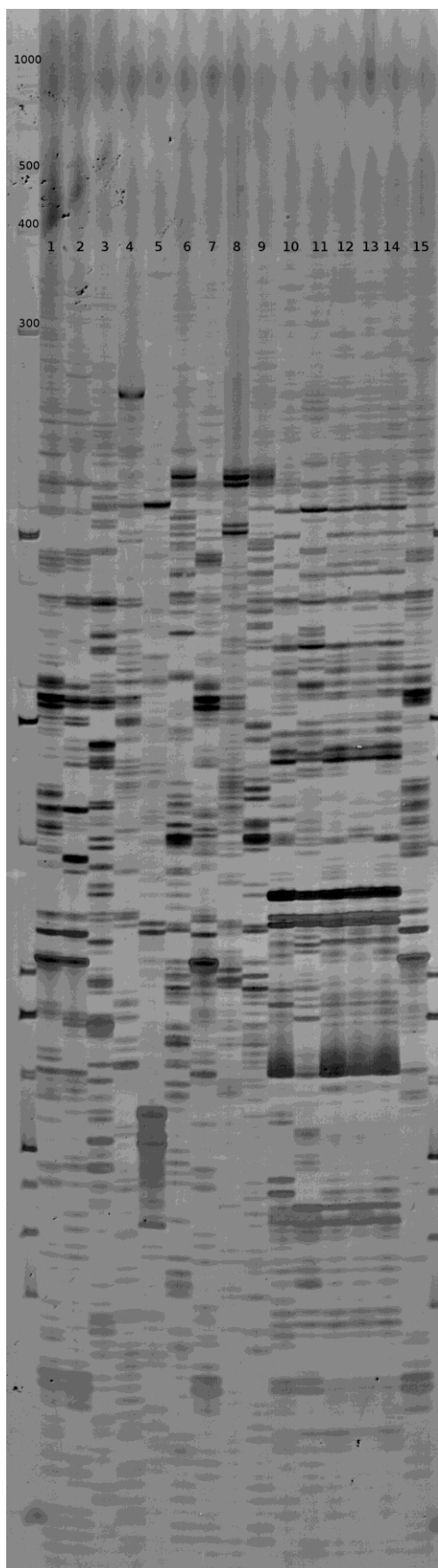


Figura 15 - Pattern elettroforetico delle combinazioni di primer C4/C5. Per il riferimento ai campioni consultare Tab. 5 e Tab. 6.

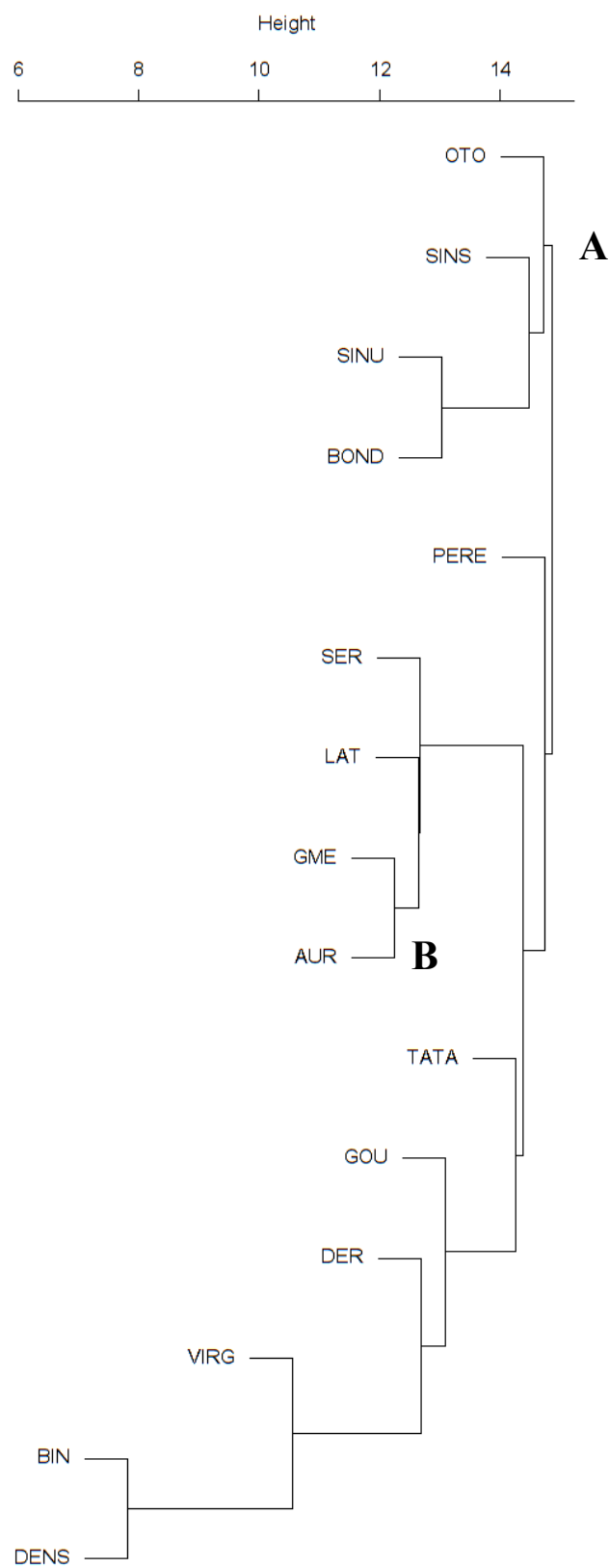


Figura 16 - Dendrogramma dei dati molecolari. Metodo= average; Distanza=euclidea.

Capitolo 5

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di caratterizzare morfologicamente e geneticamente una collezione di germoplasma di *Limonium* conservata presso il CRA-VIV di Pescia, avvalendosi di marcatori biometrici e molecolari.

Dal punto di vista della caratterizzazione biometrica, i risultati ottenuti si sono rivelati attinenti alle informazioni bibliografiche di riferimento, dimostrando un buon livello di conservazione delle specie in collezione rispetto al germoplasma originario. Inoltre la scelta dei parametri utilizzati per l'indagine si è dimostrata buona ma potrebbe essere migliorata mediante l'inserimento di parametri come il tipo di stimma e la posizione dello stilo rispetto alle antere, utili per l'individuazione dei gruppi interfecondi.

La caratterizzazione molecolare con l'uso di marcatori AFLP è risultata piuttosto laboriosa. In primo luogo a causa della scarsa qualità del materiale di partenza nella fase di messa a punto dei protocolli di estrazione e di amplificazione. In secondo luogo poiché, in fase operativa, non disponendo di un sequenziatore automatico, si è dovuto ricorrere a sistemi elettroforetici tradizionali con ingente dispendio di tempo.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti mediante analisi AFLP, l'interpretazione dei dati si è rivelata coerente con le osservazioni fenotipiche, i dati bibliografici e la precedente analisi biometrica per ben 13 delle 15 specie esaminate. I dubbi sorti nell'interpretazione di alcuni raggruppamenti potrebbero trovare una motivazione nel fatto che molte delle specie prese in esame sono ibridi intraspecifici e non è stato possibile inserire nell'indagine le linee pure di riferimento perché non più commercializzate dalle ditte sementiere.

Tali risultati, comunque positivi ed alquanto promettenti, sono da considerarsi pertanto preliminari trattandosi della prima esperienza di applicazione dei marcatori molecolari AFLP

alla collezione di *Limonium* del CRA-VIV Pescia, probabilmente unica per numero di specie e di accessioni. Inoltre, trattandosi di una caratterizzazione interspecifica, non sono da escludere errori in fase di *scoring* in quanto le bande polimorfiche individuate potrebbero non corrispondere alle stesse sequenze genomiche pure, essendo delle stesse dimensioni.

Per questo motivo, uno degli aspetti che verrà preso in considerazione nelle future fasi del progetto RGV-FAO sarà quello di effettuare analisi filogenetiche basate su sequenze altamente conservate (es. ITS), con l'auspicio di chiarire i dubbi rimasti.

Dal punto di vista della messa a punto di protocolli integrati di caratterizzazione filogenetica, è necessario affermare che i marcatori biometrici, se opportunamente adattati al contesto in cui vengono applicati, risultano piuttosto affidabili e sicuramente economici. Tuttavia le indagini non possono essere condotte prima di due anni dalla semina poiché è indispensabile che le piante siano nel pieno dello sviluppo.

In merito ai marcatori molecolari, invece, il principale vantaggio riscontrato è stato che le analisi possono essere condotte in ogni momento della fase vegetativa della pianta. Tuttavia, tale tecnica risulta dispendiosa sia in termini economici che operativi.

Considerando gli sviluppi futuri a cui tale progetto potrà portare, vi è l'aspetto della conservazione ed arricchimento della collezione, con il reperimento delle linee pure mancanti e l'inserimento di nuove specie. Mentre per quanto riguarda le analisi molecolari, verrà portata avanti l'indagine con marcatori AFLP, estendendola ad un numero più ampio di accessioni. Inoltre verranno messe a punto tecniche innovative di marcatura molecolare con lo scopo di individuare quelle più idonee alla caratterizzazione interspecifica.

Capitolo 4

PUBBLICAZIONI E PRESENTAZIONI A CONVEGNI

ANTONETTI M., TEANI A., BURCHI G., 2009. Valorizzazione commerciale e conservazione di germoplasma del genere *Limonium* Miller. RIASSUNTI del 4° Workshop Piante Mediterranee “Le potenzialità del territorio e dell'ambiente”, Marina di Nova Siri (MT), 8-10 ottobre 2009, pag.39.

TEANI A., ANTONETTI M., BARTOLINI L., 2010. Caratterizzazione genetica, documentazione e valorizzazione di una collezione di germoplasma di *Limonium* spp. con metodi biometrici e biologico-molecolari. RIASSUNTI dei lavori presentati alle IX Giornate Scientifiche SOI. Italus Hortus, suppl. al n.2: pag. 34

TEANI A., ANTONETTI M., BARTOLINI L., BURCHI G., CAMUSSI A., 2010. Comparison of biometric and molecular techniques for the identification of new *Limonium* spp. hybrids. ADVANCES IN HORTICULTURAL SCIENCES 24(4): 233-242

ANTONETTI M., TEANI A., BURCHI G., 2010. Valorizzazione commerciale e conservazione di germoplasma del genere *Limonium* Miller. Piante Mediterranee - Le potenzialità del territorio e dell'ambiente”, Editors Sarli G., Alvino A., Cervelli C., LULU Enterprises Inc., pag. 133-140

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

ANONYMOUS, 1977. *Limonium*. in: Dictionary of Gardening Vol. 2 (2nd ed.), Ed. Chittenden; Clarendon Press, Oxford, pp. 1179-1181.

BAILEY L.H., 1958. *Limonium*. In: The standard cyclopedia of horticulture. THE MACMILLIAN COMPANY ed., New York, pp. 3229-3232.

BAKER H.G., 1948. Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae. I: A survey of the family. Ann. Bot. (London), 17: 433-455

BAKER H.G., 1953. *Pollen and stigma in the genus Limonium*. Ann. Bot. (London) 12: 207-219.

BAKER H.G., 1954. *Dimorphism and incompatibility in the Plumbaginaceae*. Proc. VIII Int. Bot. Congr., Paris, sect. 10: 138-145.

BAKER H.G., 1966. *The evolution, functioning and break-down of eteromorphic incompatibility system. I: The Plumbaginaceae*. Evolution, 20: 349-368.

BOISSIER E., 1848. *Plumbaginales*. In A. P. de Candolle [ed.], Prodrum systematis naturalis regni vegetabilis, 12: 617-696. Treuttel et Wurz, Paris, France.

BOISSIER E., 1859. *Diagnoses plantarum orientalium novarum*. Ser. 2, 4: 61-71. Paris, France.

- BRUNA S., BURCHI G., DE BENEDETTI L., MERCURI A., PECCHIONI N., BIANCHINI C., SCHIVA T. 2005. Molecular analysis of *Limonium* genus through RAPD markers. *Agricoltura mediterranea* 135(1): 52-58
- BRUNA S., DE BENEDETTI L., MERCURI A., SCHIVA T., BURCHI G., PECCHIONI N., AGRIMONTI C. 2004. Use of RAPD markers for the genetic characterization of *Limonium* species. *Acta Hort. (ISHS)* 651:155-160
- COWAN R., INGROUILLE M.J., LLEDO' M.D., 1998. *The taxonomic treatment of angiosperms in the genus Limonium Mill. (Plumbaginaceae)*. *Folia Geobotanica* 33: 353-366.
- D'AMATO F., 1949. *Triploidia e apomissia in Statice oleifolia Scop. Var. confusa Godr.* *Caryologia* 2(1): 71-84
- DIANA S., 1992. *Alcuni aspetti della biologia della riproduzione del genere Limonium*. *Giornale botanico italiano* 126 (2): 187-195
- DOLCHER T., PIGNATTI S., 1971. Un'ipotesi sull'evoluzione dei *Limonium* del bacino del Mediterraneo. *Giorn. Bot. Ital.*, 105(2): 95-107
- DUHAZÉ C., GANEUL D., LEPORT L., LARHER F.R., BOUCHEREAU A., 2003. *Uracil as one of the multiple sources of β -alanine in Limonium latifolium, a halotolerant β -alanine betaine accumulating Plumbaginaceae*. *Plant. Physiol. Biochem.* 41: 993-998
- DULBERGER R., DVOSKIN-DORON S., 1989. *Agamospermy in Limonium graecum, L. oleifolium and L. thouinii*. *Amer. J. Bot.*, suppl., 76(6): 287
- ERBEN m., 1978. *Die gattung Limonium im sudwestmediterranean raum*. *Mitt. Bot. Staatssamml, Munchen*, 14: 361-631
- ERBEN M., 1979. *Karyotype differentiation and its consequences in Mediterranean Limonium*. *Webbia*, 34 (1): 409-417

ERBEN M., 1993. *Limonium* Miller. In: Castroviejo S. et al., *Flora Iberica*, 3: 2-143

GREUTER W., MCNEILL J., BARRIE F. R., BURDET H.-M., DEMOULIN V.,
FILGUEIRAS T.S., NICOLSON D. H., SILVA P. C., SKOG J. E., TREHANE P.,
TURLAND N. J., HAWKSWORTH D. L. [EDS.], 2000. *International code of botanical
nomenclature (Saint Louis Code)*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany [Regnum
Vegetabile 138]

HANSON A.D., RATHINASABAPATHI B., RIVOAL J., BURNET M., DILLON M.O.,
GAGE D.A., 1994. *Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment
in metabolic engineering of stress tolerance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 306-310

HOOKER J. D., 1876. *Plumbaginaceae*. In G. Bentham and J. D. Hooker [eds.], *Genera
plantarum ad exemplaria imprimis in herbariis Kewensibus servata*, vol. 2, 623–628. Reeve &
Co., London, UK

INGROUILLE M.J., 1984. *A taxonomic analysis of Limonium (Plumbaginaceae) in Western
Europe*. Plant Syst. Evol., 147: 103-118

JONES C.J., EDWARDS K.J., CASTAGLIONE S., WINFIELD M.O., SALA F., VAN DE
WIEL C., BREDEMEIJER G., VOSMAN B., MATTHES M., DALY A.,
BRETTSCHEIDER R., BETTINI P., BUIATTI M., MAESTRI E., MALCEVSCHI A.,
MARMIROLI N., AERT R., VOLCKAERT G., RUEDA J., LINACERO R., VAZQUEZ A.,
KARP A., 1997. *Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a
network of European laboratories*. Mol. Breed. 3:381–390

KARIS P. O., 2004. *Taxonomy, phylogeny and biogeography of Limonium sect. Pteroclados
(Plumbaginaceae), based on morphological data*. Botanical Journal of the Linnean Society
144: 461–482

KUBITZKI K., 1993. *Plumbaginaceae*. In: Kubitzki et al. (eds.), *The families and genera of
vascular plants 2*, Springer Verlag, Berlin, pp. 523-530

LLEDO´ M. D., ERBEN M., CRESPO M. B., 2003. *Myriolepis*, a new genus segregated from *Limonium* (Plumbaginaceae). *Taxon*: 52: 67–73

PALACIOS C., KRESOVICH S., GONZALEZ-CANDELAS F., 1999. A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 645-657

PALOP-ESTEBAN M., GONZÁLEZ-CANDELAS F., 2002. Development of microsatellite markers for the critically endangered *Limonium dufourii* (Girard) Kuntze (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology Notes* 2(4): 521–523.

Palop M., Palacios C., González-Candelas F., 2000. Development and across species transferability of microsatellites markers in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae). *Conservation Genetics* 00: 1-3.

PAX F., 1889. *Plumbaginaceae*. In A. Engler and K. Prantl [eds.], *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 4, 116–125. W. Englemann, Leipzig, Germany

PIGNATTI S., 1971. *Studi sui Limonium*, VIII. In V. H. Heywood [ed.], *Florae Europaea. Notulae systematicae ad flora Europaeam spectantes*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64: 353–381

PIGNATTI S., 1972. *Limonium*. In T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. A. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, and D. M. Moore [eds.], *Flora Europaea*, vol. 3, 38–50. Cambridge University Press, Cambridge, UK

POWELL W., MACHRAY G.C., PROVAN J., 1996. *Polymorphism revealed by simple sequence repeats*. *Trends in Plant Science*, 1: 232-249

RIVOAL J., HANSON A.D., 1993. *Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus Limonium*. Plant Physiol. 101: 553-560

TEANI A., ANTONETTI M., BARTOLINI L., BURCHI G., CAMUSSI A., 2010. *Comparison of biometric and molecular techniques for the identification of new Limonium spp. Hybrids*. Adv. Hort. Sci. 24(4): 233-242

UPOV, 1999. *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. Statice [Limonium Mill., Goniolimon Boiss. And Psylliostachys (Jaub. & Sapch) Newsky]*. TG/168/3

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research. 23(21): 4407-4414

WEBER M.O., 1981. *Pollen diversity and identification in some Plumbaginaceae*. Pollen&Spores, 23(3-4): 321-348.

RINGRAZIAMENTI

Lo svolgimento di questo dottorato si è rivelato fin dalle prime battute pieno di ostacoli rappresentando per me una valida palestra di vita e una imperdibile occasione per crescere e maturare.

Devo innanzitutto ringraziare il mio tutor, Dott. Gianluca Burchi, che mi ha sempre supportata (e sopportata) ed ha contribuito ad ampliare il mio bagaglio di conoscenze nel campo della floricoltura, ambito nel quale ho cominciato a muovere i primi passi proprio in occasione di questo dottorato. Mi ha sempre aiutata nei numerosi momenti difficili e mi ha contagiata con la sua instancabile energia e il suo immancabile spirito

Grazie a questa opportunità mi sono affacciata, poco tempo dopo la laurea, al mondo del lavoro e per questo devo principalmente e doverosamente ringraziare il Dott. Antonio Grassotti che mi ha dato fiducia e mi ha accolta nella piccola grande famiglia del CRA-VIV. La sua passione e dedizione al lavoro e all'istituto sono stati per me di grande stimolo e saranno sempre un esempio da prendere a modello.

Questo lavoro inoltre si sarebbe rivelato per me molto più difficoltoso se non fosse stato per la costante presenza di Maurizio, che mi ha immediatamente accolta e coinvolta nei progetti di ricerca dedicati al Limonium, insegnandomi tutto quello che so sul temibile (per me) mondo della botanica e sistematica di questo genere. Se adesso sono in distinguere un Limonium da un erbaccia lo devo solo a lui. La sua presenza mi ha aiutata a vivere serenamente questa esperienza rivelandosi un compagno d'avventure sempre pronto ad ascoltare e a chiarire ogni dubbio.

Vorrei inoltre ringraziare i miei colleghi Beatrice, Domenico, Sara, Simona, Silvia e Sonia che soprattutto in questo ultimo periodo hanno sopportato l'incredibile caos che ho creato in laboratorio. Un ringraziamento particolare va poi a Jacopo, a cui passo il testimone nel nuovo ciclo di questo dottorato, compagno quotidiano di viaggio da Lucca a Pescia. A lui auguro con tutto il cuore che i prossimi tre anni siano stimolanti e ricchi di esperienze come lo sono stati per me. E a Linda che mi ha dimostrato una grande fiducia ed è stata una compagna di lavoro preziosa.

Ringrazio poi tutto il personale del CRA-VIV sperando di non dimenticare nessuno: Angela, Amedeo, Ennio, Giuseppe, Lorena, Monica, Paolo, Silvana.

Questi tre anni sono stati anni sì di lavoro ma anche di vita quotidiana fatta di alti e bassi e di momenti da ricordare che non sarebbero stati tali senza la presenza del mio compagno Francesco a cui dedico questo lavoro di tesi sperando che gli sia di ispirazione per il futuro, mi ha sempre sostenuta e non si è mai tirato indietro quando ho avuto bisogno di lui.

Ringrazio poi la mia famiglia per il costante aiuto e sostegno durante gli anni di studio i loro insegnamenti e la loro presenza hanno fatto di me la persona adulta che sono adesso.

Grazie.