



**Il Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le
Foreste, la Natura e l'Energia
DAFNE**

Dottorato di ricerca (XXV CICLO)

“Scienze e tecnologie per la gestione forestale e ambientale”

Taxus baccata: un approccio citogenetico e molecolare

Dottoranda Maria Paola Tomasino

Coordinatore del corso

Prof.ssa Rosanna Bellarosa

Tutore

Prof. Bartolomeo Schirone

Co-tutore

Prof.ssa Carla Ceoloni

PREMESSA

Taxus baccata (L. 1753) è una specie forestale dioica, che negli ultimi venti anni è stata oggetto di numerosi ed importanti studi legati soprattutto alla scoperta delle proprietà del tassolo, un principio attivo naturale che si trova in questa specie, e che si è rivelato di grande efficacia nelle terapie antitumorali (Slichenmyer *et al.*, 1993). Tuttavia, nonostante l'interesse a conservare e propagare la specie come fonte di tassolo, mancano esperienze relative alla realizzazione di piantagioni di *T. baccata* per fini commerciali. L'estrazione del tassolo viene effettuata piuttosto da piante spontaneamente presenti in natura, ma questo comporta la morte di migliaia di alberi, a fronte di una minima quantità di principio attivo da essi ricavato. È per questo che il tasso, già poco comune allo stato spontaneo, corre un reale pericolo di estinzione, al punto che in alcune regioni esso è considerato specie protetta. (Hageneder, 2007; Schirone *et al.*, 2003).

Considerata l'importanza commerciale e le problematiche annesse alla salvaguardia del tasso, risulta importante approfondire aspetti relativi all'ecologia e biologia che per tale specie sono poco conosciuti.

Da molti anni ormai, il gruppo di ricerca del dipartimento DAFNE, guidato dal professor Bartolomeo Schirone, si occupa dello studio del tasso sotto vari aspetti (distribuzione, caratteristiche dendrologiche e fenologia). Tali ricerche hanno incluso, tra l'altro, un monitoraggio annuale del popolamento di tasso presso Carpineto Romano, sui Monti Lepini (RM). Tale monitoraggio ha rivelato nel corso degli anni un comportamento molto interessante: è stato rilevato infatti che una consistente percentuale di individui di *T. baccata* subisce di anno in anno un cambiamento di sesso. Questa osservazione, sporadicamente riportata in letteratura in *Taxus baccata* (Keen e Chadwick, 1954), ha rivelato infatti un aspetto fino ad allora considerato come un'eccezione riguardante al massimo l'1% delle piante (Iszkulo, 2009). Si tratta del *sex-reversal* o più precisamente *sex-shifting*, ovvero la capacità di poter cambiare sesso da un anno all'altro.

Tale fenomeno ha suscitato una serie di interrogativi sull'ecologia e sul comportamento sessuale di questa specie, stimolandone studi approfonditi sulle

differenze morfologiche ed ecologiche tra i due sessi, al fine di comprendere se esistano o meno caratteristiche ambientali che inducono il *sex-shifting*, e se esso influenzi indifferentemente piante maschili o femminili (Vessella e Schirone, 2011; tesi di dottorato Salis, 2012).

A seguito di queste importanti considerazioni, parallelamente agli studi dendrologici, fenologici e sulle strategie riproduttive, nel presente progetto di ricerca si è ritenuto fondamentale gettare le basi per un approccio genetico-molecolare e citogenetico su *Taxus baccata*. Tali indagini, sono state promosse dalla curiosità scientifica di indagare l'esistenza nel tasso di una predeterminazione genetica alla nascita nell'espressione sessuale e sono state indirizzate in primo luogo alla ricerca della presenza o meno di cromosomi sessuali nella specie.

Il perseguimento di tale obiettivo ha previsto un iniziale consolidamento delle tecniche di propagazione vegetativa di *T. baccata*, già condotte dal team del professor Bartolomeo Schirone negli anni passati, che si è avvalso dell'esperienza del Sig. Armando Parlante. In primo luogo sono stati attuati esperimenti relativi a pratiche di taleaggio della specie *T. baccata* presso il Vivaio Sperimentale Forestale, parallelamente ai quali è stata sperimentata, in laboratorio, la micropropagazione *in vitro* della specie.

I risultati ottenuti dalla propagazione agamica, nello specifico gli apici radicali delle talee (messe a dimora durante il primo anno di dottorato), hanno rappresentato il materiale idoneo per le analisi citogenetiche.

Tuttavia essendosi manifestata, sin dai primi mesi, la difficoltà di raggiungere evidenze sperimentali in merito alle interessanti condizioni sessuali di questa pianta, il presente progetto di tesi si è imposto come principale obiettivo l'approfondimento di aspetti genetico, molecolari e citogenetici in *T. baccata*, sulla base di uno studio cromosomico degli individui di questa specie, al fine di studiare e convalidare il cariotipo del tasso, avvalendosi delle più moderne tecniche cito-molecolari.

Gli esperimenti di citogenetica sono stati svolti presso il Laboratorio di Citogenetica Vegetale del Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia. Grazie all'expertise del team della professoressa Carla Ceoloni ed alla professionalità del Dott. Andrea

Gennaro, sono stati messi a punto in via inedita protocolli di “visualizzazione dei cromosomi in apici radicali di *T. baccata*” e sono state contestualmente testate con successo le tecniche della *Multicolour FISH* e la *ND-FISH* su piastre metafasiche di *T. baccata*.

Nella prima parte del lavoro, sarà presentata un'introduzione teorica costituita da: un breve excursus sulla sessualità delle piante; un compendio sullo stato dell'arte relativo alla citogenetica forestale, intesa come strumento che permette di effettuare un'analisi dei cariotipi nelle specie forestali; una parte terminale che descrive la biologia e l'ecologia della specie *T. baccata* e presenta, come caso studio, il monitoraggio del popolamento del tasso effettuato presso Carpineto Romano (RM).

La parte centrale del lavoro sarà quindi dedicata alla sezione sperimentale si concluderà con la discussione dei risultati ottenuti e relative conclusioni.

Sebbene molti interrogativi sulla specie restino irrisolti, il presente lavoro di ricerca ha permesso di approfondire un fenomeno ecologico, come l'espressione sessuale di *Taxus baccata*, tramite un approccio multidisciplinare, rendendo possibile un intreccio di diverse professionalità, attraverso l'utilizzo di tecniche di citogenetica come supporto alle pratiche vivaistiche e alle osservazioni fenologiche in campo.

INDICE

Introduzione	pag.	1
1. Sessualità nelle piante	pag.	2
1.1 Meccanismi di determinazione sessuale	pag.	3
1.2 Cromosomi sessuali nelle piante, evoluzione e filogenesi	pag.	5
1.3 Cromosomi sessuali nelle Gimnosperme	pag.	11
1.4 Considerazioni conclusive sui sistemi sessuali nel regno vegetale	pag.	13
2. Citogenetica forestale	pag.	15
2.1 Ibridazione <i>in situ</i> : cenni preliminari	pag.	16
2.2 Ibridazione <i>in situ</i> su cromosomi metafasici	pag.	18
2.3 Marcatori molecolari come sonde	pag.	19
2.4 Progetti di sequenziamento e database	pag.	25
3. <i>Taxus baccata</i> L.	pag.	30
3.1 Areale e inquadramento sistematico	pag.	31
3.2 Morfologia e biologia	pag.	34
3.2.1 Caratteristiche riproduttive	pag.	36
3.2.2 Germinabilità	pag.	37
3.3 Tossicità e proprietà chemioterapiche	pag.	39
3.4 Propagazione agamica	pag.	40
3.5 Citogenetica	pag.	43
3.6 Caso studio: fenomenologia sessuale di <i>Taxus baccata</i> nel popolamento di Carpineto Romano (RM)	pag.	45
Parte Sperimentale	pag.	47

4. Materiali e Metodi	pag.	48
4.1 Materiale vegetale	pag.	48
4.1.1 Talee legnose di <i>T. baccata</i>	pag.	49
4.1.2 Talee erbacee di <i>T.baccata</i> : trattamento degli apici caulinari	pag.	51
4.1.3 Micropropagazione <i>in vitro</i> di <i>T. baccata</i>	pag.	52
4.2 Metodi: tecniche molecolari e citogenetiche	pag.	56
4.2.1 Sonde per l'ibridazione <i>in situ</i>	pag.	56
4.2.2 Ottenimento dei preparati citologici	pag.	60
4.2.3 FISH: <i>Fluorescent In situ Hybridization</i>	pag.	63
4.2.3.1 Marcatura delle sonde	pag.	63
4.2.3.2 Pretrattamenti dei preparati citologici	pag.	65
4.2.4 Ibridazione <i>in situ</i> con la tecnica della FISH	pag.	66
4.2.5 Lavaggi post-ibridazione e rilevamento	pag.	67
4.2.6 Reibridazione dei preparati microscopici	pag.	69
4.2.7 Ibridazione con SSRs (ND-FISH)	pag.	70
4.2.8 Tecniche di bandeggio con fluorocromi	pag.	71
4.2.9 Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini	pag.	72
4.2.10 Misure morfometriche e classificazione dei cromosomi	pag.	72
5. Risultati	pag	73
5.1 Risultati della propagazione vegetativa di <i>T. baccata</i>	pag	73
5.1.1 Radicazione di talee legnose	pag	73
5.1.2 Propagazione vegetativa degli apici caulinari	pag	74
5.1.3 Micropropagazione <i>in vitro</i>	pag	75
5.2 Risultati delle analisi citogenetiche e molecolari	pag	78
5.2.1 Visualizzazione dei cromosomi di <i>T. baccata</i> negli apici radicali provenienti da talee di due anni	pag.	78
5.2.2 Visualizzazione dei cromosomi di <i>T. baccata</i> negli apici	pag.	78

vegetativi e negli embrioni germinati in vitro		
5.2.3. Visualizzazione dei cromosomi di <i>T. baccata</i> negli apici radicali provenienti da talee sette mesi d'età	pag.	80
5.2.4 Misure morfometriche e classificazione dei cromosomi	pag.	81
5.2.5 Digestione enzimatica	pag.	84
5.2.6 Analisi molecolari amplificazione per PCR delle sonde	pag.	85
5.2.7 Risultati dell'ibridazione fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	pag.	86
5.2.8 Risultati ibridazione ND-FISH con microsatelliti	pag.	88
5.2.9 Risultati delle tecniche di bandeggio cromosomico	pag.	90
6. Discussione	pag.	91
7. Conclusioni e prospettive	pag.	98
8. Bibliografia	pag.	100

Introduzione

1. Sessualità nelle piante

I sistemi sessuali nelle piante sono dei più eterogenei, comprenderne le origini e l'evoluzione richiede l'analisi di dati provenienti da più campi tra cui l'ecologia, la biologia evolutiva e la genetica. Da un punto di vista evolutivo, le piante permettono di tracciare le fasi dello sviluppo dei meccanismi riproduttivi, più di quanto sia possibile studiando la biologia animale.

Mentre negli antenati dei mammiferi, la comparsa dei cromosomi sessuali è databile intorno a 50 milioni di anni fa, nelle piante questo è un processo relativamente giovane, iniziato meno di 10 milioni di anni fa. Ciò spiega perché sia ancora in atto e per questo sia oggetto di numerose osservazioni e ricerche.

L'evoluzione più recente dei cromosomi sessuali nel regno vegetale (Fig.1.1), rispetto a quanto successo nei mammiferi o negli insetti (*Drosophila*) difatti, ha incrementato nelle ultime decadi gli studi e le indagini evolutive circa i meccanismi sessuali e la determinazione del sesso nelle piante (Ming e Moore, 2007; Charlesworth 2012).

Invero, approfondimenti circa la loro comparsa ed il loro sviluppo, permettono di far luce sui meccanismi che hanno determinato l'origine dell'unisessualità nel regno vegetale (Charlesworth, 2012).

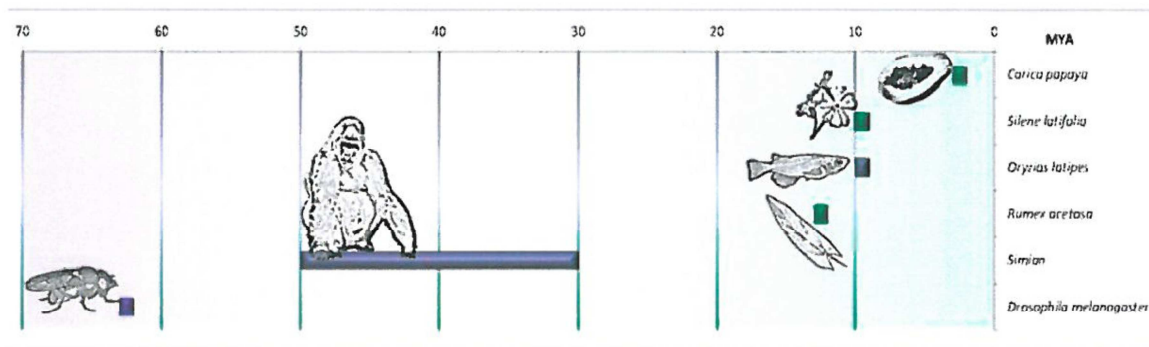


Figura 1.1. Diagramma della ricostruzione temporale dell'origine dei cromosomi sessuali in diverse specie modello (Sola-Campoy *et al.*, 2012): Insetti, *Drosophila melanogaster* (Carvalho *et al.*, 2009); pesci *Oryzias latipes* (Kondo *et al.*, 2004); mammiferi, scimmie (Lahn e Page, 1999); piante a fiore *Rumex acetosa* (Navajas-Perez *et al.*, 2005), *Silene latifolia* (Nicolas *et al.*, 2005) e *Carica papaya* (Yu *et al.*, 2008a).

Gli organismi oggetto di maggiori studi circa i diversi modelli evolutivi dei cromosomi sessuali nelle piante, sono per lo più specie modello come *Carica papaya*, *Silene latifolia* e

Rumex acetosa. Nonostante ciò si sono incrementati nell'ultimo decennio anche studi su organismi non modello (Ming *et al.*, 2011).

La comprensione dei sistemi riproduttivi, delle strategie di determinazione sessuale e dei geni *sex-linked*, risulta essere di fondamentale importanza anche per studi pratici ed applicativi sul miglioramento delle specie coltivate.

Lo sviluppo di tecniche all'avanguardia nel campo della biologia molecolare e della genomica, raggiunto negli ultimi venti anni, ha difatti reso possibile un'indagine più accurata nel campo della sessualità delle piante, clonando i geni coinvolti nella determinazione sessuale e sequenziando i cromosomi sessuali, così come era già avvenuto in passato per i mammiferi (Skalesky *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2005).

Sono stati clonati geni responsabili della determinazione sessuale nelle piante di interesse agronomico come il mais (DeLong *et al.*, 1993; Bensen *et al.*, 1995), sono inoltre state costruite mappe dei cromosomi sessuali nella papaia, *Carica papaya* (Zhang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008a), nell'asparago *Asparagus officinalis* (Telgmann-Rauber *et al.*, 2007) nel kiwi, *Actinidia deliciosa* (Harvey *et al.*, 2007), nella fragola (*Fragaria virginiana*) (Goldberg *et al.*, 2010), ed anche in specie arboree come il pioppo (Tuskan *et al.*, 2006).

Tale disponibilità di nuovi dati genomici, genetici e molecolari ha permesso di far luce sul processo di evoluzione dei cromosomi sessuali anche su specie non coltivate.

1.1 Meccanismi di determinazione sessuale

Da un punto di vista strettamente biologico ed evolutivo è interessante osservare che nelle piante la maggior parte delle specie “attualmente dioiche” (caratterizzate dalla presenza di sessi separati su individui diversi) si siano evolute, da un ancestore ermafrodita o monoico, caratterizzato dal possedere sullo stesso individuo funzioni di entrambi i sessi.

Da quasi un secolo infatti si è concordi nell'idea che l'ermafroditismo, come condizione sessuale, sia comparso molto prima della gonocoria o dioicismo con una serie di passaggi sequenziali tra cui il monoicismo (Freeman, 1997).

Lo sviluppo di strutture riproduttive quali lo stamen e il carpello coinvolge una serie di funzioni genetiche specializzate che sono richieste a diversi stadi di sviluppo della pianta, e l'occorrenza di mutazioni in uno qualsiasi dei geni regolatori tali meccanismi sessuali, può

comportare l'aborto o la perdita delle funzioni degli organi riproduttivi maschili o femminili. (Wellmer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

La comparsa di geni caratterizzanti strutture esclusivamente maschili e femminili ha determinato lo sviluppo delle strutture riproduttive unisessuali, segnando l'inizio dell'evoluzione dei cromosomi sessuali (Ming *et al.*, 2011).

Tuttavia, sebbene nel mondo animale l'unisessualità rappresenti un traguardo evolutivo, il dioicismo è una condizione rara tra le piante, che caratterizza il 38% delle Angiosperme, ed un ristretto numero di Gimnosperme, funghi e briofite (Charlesworth e Guttman., 1999; Ming *et al.*, 2011).

Nel mondo vegetale la determinazione sessuale è un meccanismo complesso, che può essere conseguenza di diversi fattori, ed al contempo è un fenomeno molto più "flessibile" di quanto avvenga nel regno animale. Nelle piante si trovano infatti organismi con condizioni sessuali intermedie rispetto all'unisessualità e all'ermafroditismo: si pensi ad individui che presentano sullo stesso individuo fiori ermafroditi e fiori unisessuati (andromonoicismo e il ginodioicismo) o piante che recano fiori ermafroditi e fiori unisessuati su individui distinti (androdioicismo e ginodioicismo).

In qualche specie può avvenire una determinazione fisiologica ovvero influenzata da ormoni, oppure una determinazione ambientale condizionata da fattori esterni come luce, temperatura, disponibilità idrica, disponibilità di nutrienti. In dettaglio, la determinazione del sesso può essere fenotipica cioè legata a fattori ambientali (*Environmental Sex Determination*), con proporzioni tra i sessi variabili e indeterminate, oppure può essere genotipica (*Genetic Sex Determination*), cioè determinata da fattori genetici. Tale fenomeno è conosciuto nelle piante fin dall'inizio del secolo scorso (Freeman, 1997).

1.2 Cromosomi sessuali nelle piante, evoluzione e filogenesi

Nell'ambito della determinazione genetica, in molte tra le specie dioiche, si è riscontrato come il sesso venga controllato non solo da geni *sex-linked*, bensì da un intero cromosoma o da una coppia di omologhi.

In queste specie i cromosomi sessuali possono presentarsi omomorfi o morfologicamente distinti. I cromosomi eteromorfi si dividono in due tipi:

- 1) sistema XY in cui il sesso maschile è eterogametico, e il sesso femminile è omogametico (XX), il più frequente tra i modelli di cromosomi sessuali eteromorfi (Ming *et al.*, 2011);
- 2) sistema ZW, in cui il sesso femminile è eterogametico ed il sesso maschile omogametico (ZZ). Quest'ultima combinazione, comune nel regno degli Uccelli (Smith *et al.*, 2009) si ritrova ad esempio in *Fragaria elatior* (Ahmadi *et al.*, 1991).

Inoltre il sesso dell'individuo può ulteriormente essere determinato dal rapporto numerico tra il numero degli X e gli altri cromosomi non sessuali (es. *Humulus lupulus*, *Rumex acetosa*) (Grabowska-Joachimciak *et al.*, 2006; Karlov *et al.*, 2003; Blocka-Wandas *et al.*, 2007; Cuñado *et al.*, 2007).

Di seguito, nella Tab.1.1, viene riportato un riassunto dei dati presenti in letteratura relativamente alle specie (circa 40 rappresentanti) in cui studi citogenetici e molecolari hanno accertato la presenza di cromosomi sessuali (Sola-Campoy *et al.*, 2012).

Tabella 1.1 Elenco delle specie vegetali più rappresentative in cui sono stati identificati cromosomi sessuali. Oltre la famiglia (*Family*) e la specie (*Species*), vengono riportate informazioni sul tipo di cromosomi sessuali; nella colonna *Sex Chromosome* è specificato il sesso eterogametico o dettagli sul sistema dei cromosomi sessuali; nella colonna *Sex det. Mechanism* viene specificato il meccanismo di determinazione sessuale: *Active- Y* se dipende dalla presenza del cromosoma eterogametico Y; *Active- W* se dipende dalla presenza del cromosoma etero gametico W, oppure *X/A* se il sesso dipende dal rapporto numerico tra il numero degli X e gli altri cromosomi non sessuali, detti autosomi (A). In Sola-Campoy *et al.* (2012) si trovano tutte i riferimenti bibliografici.

Family	Species	Sex chromosome	Sex det. mechanism
Angiosperms			
<i>Actinidiaceae</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	Heterogametetic male	Active-Y
	<i>Actinidia chinensis</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus sp.</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Asparagaceae</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Asteraceae</i>	<i>Antennaria dioica</i>	Heterogametetic male	-
<i>Cannabaceae</i>	<i>Cannabis sativa</i>	♀XX/ ♂XY	X/A ratio
	<i>Humulus lupulus</i>	♀XX/ ♂XY	X/A ratio
	<i>Humulus japonicus</i>	♀XX/ ♂XY ₁ Y ₂	X/A ratio
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Carica papaya</i>	Heterogametetic male	Active-Y
	<i>Vasconcellea sp.</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Silene latifolia</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
	<i>Silene dioica</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Bryonia dioica</i>	Heterogametetic male	Active-Y
	<i>Echallium elaterium</i>	Heterogametetic male	Active-Y
	<i>Coccinia indica</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Dioscoreaceae</i>	<i>Dioscorea tokoro</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Mercurialis annua</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Polygonaceae</i>	<i>Rumex acetosa</i> group	♀XX/ ♂XY ₁ Y ₂	X/A ratio
	<i>Rumex acetosella</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
	<i>Rumex hastatulus</i>	♀XX/ ♂XY or ♂XY ₁ Y ₂	Active-Y- X/A ratio
	<i>Rumex suffruticosus</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Thalictrum sp.</i>	Heterogametetic male	-
<i>Rosaceae</i>	<i>Fragaria vesca</i>	Heterogametetic female	Active-W
	<i>Fragaria chiloensis</i>	Heterogametetic male	Active-Y
	<i>Fragaria virginiana</i>	Heterogametetic male	Active-Y
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra</i>	♂ZZ/ ♀ZW	Active-W
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis sp.</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
Gymnosperms			
<i>Cycadaceae</i>	<i>Cycas revoluta</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
	<i>Cycas pectinata</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Ginkgoaceae</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Podocarpaceae</i>	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	♀XX/ ♂XXY	-
<i>Zamiaceae</i>	<i>Zamia sp.</i>	Heterogametetic male	-
Bryophyta			
<i>Marchantiaceae</i>	<i>Marchantia polymorpha</i>	♀XX/ ♂XY	Active-Y
<i>Sphaerocarpaceae</i>	<i>Sphaerocarpos donnellii</i>	♀XX/ ♂XY	-
Algae			
<i>Phaeophyceae</i>	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	-	-

Negli organismi dioici si ritiene che i cromosomi sessuali si siano evoluti da una coppia di autosomi, come conseguenza di successive ricombinazioni tra regioni contenenti geni coinvolti nei meccanismi di determinazione sessuale, che hanno comportato la degenerazione del cromosoma Y. La condizione di dioicismo quindi sarebbe evoluta

gradualmente, attraverso un processo articolato in tre successivi stadi evolutivi (Charlesworth *et al.*, 1996).

In qualche caso deriva da un comune antenore monoico, passando attraverso due stadi transitori di andromonoicismo e ginomonoicismo, e raggiungendo finalmente la fissazione della *sex-ratio* tra gli individui (Renner e Ricklefs, 1995). Più frequentemente deriverebbe da un antenore ermafrodita che attraversa gli stadi intermedi di gimnodiocismo e androdioicismo (quest'ultimo molto raro nelle piante), come mostrato in Fig. 1.2.

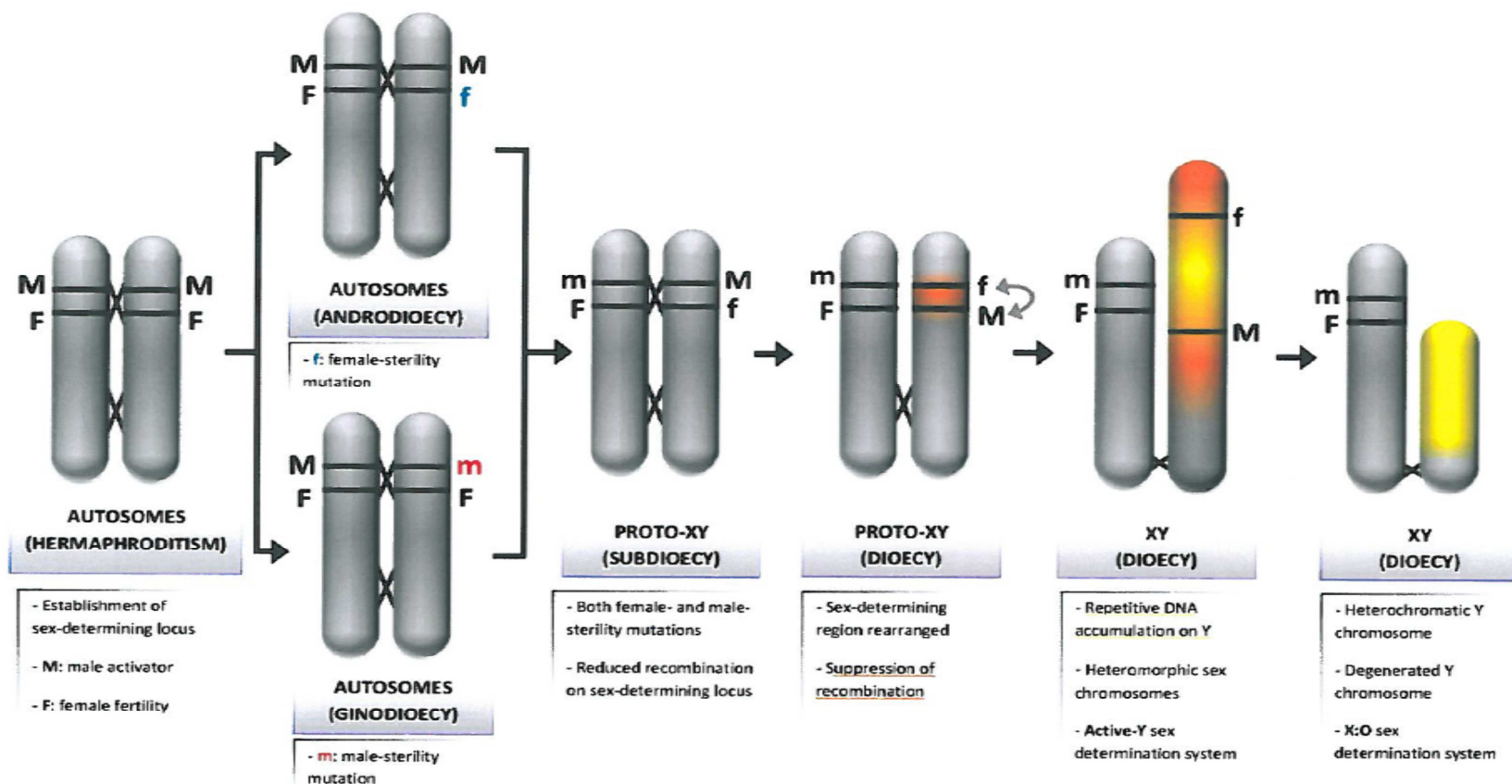


Figura 1.2. Descrizione schematica del processo di sviluppo dei cromosomi sessuali. Il percorso parte dall'ermafroditismo (HERMAPHRODITISM) fino alla dioecia (DIOECY) attraverso stadi intermedi di androdioicismo (ANDRODIOECY) e ginodioicismo (GINODIOECY), in cui si sono fissate prima regioni *sex-linked* ovvero recanti le mutazioni per la sterilità femminile (**f- female sterility mutation**) e la sterilità maschile (**m- male sterility mutation**); nello stadio finale si distinguono gli interi cromosomi sessuali. In grigio sono rappresentate le regioni ricombinanti degli autosomi e degli "pseudo-autosomi", in arancione le regioni caratterizzate dalla soppressione di ricombinazione e in giallo le zone caratterizzate da elementi ripetitivi e trasponibili del DNA che si sono accumulati progressivamente nel cromosoma Y (Sola-Campoy *et al.*, 2012).

Nel primo stadio avviene la fissazione dei locus/loci sessuali sui cromosomi autosomici (sono necessarie almeno due tipi di mutazioni: quella responsabile della sterilità maschile e quella della sterilità femminile).

Il secondo stadio prevede la soppressione delle ricombinazioni tra le regioni geniche coinvolte nei meccanismi di determinazione sessuale; essa è favorita principalmente da una sorta di riarrangiamento cromosomico, la quale causa la degenerazione del cromosoma Y (o del cromosoma W in un sistema del tipo WZ).

Nell'ultimo stadio la ricombinazione può avvenire solo in piccole e ristrette regioni, dal momento che i cromosomi X e Y sono diventati così divergenti, di conseguenza il cromosoma Y o W rimane altamente degenerato ed eterogametico.

La progressiva soppressione delle possibilità di ricombinazioni tra i cromosomi sessuali, dovuta soprattutto a riarrangiamenti cromosomici -es. duplicazioni, inversioni, traslocazioni- (Stainemann e Stainemann, 1997; Skaletsky *et al.*, 2003), non è altro che la conseguenza dell'accumulo di sequenze di DNA altamente ripetitivo, quali elementi trasponibili e DNA satellite.

Tali inserzioni potrebbero infatti contribuire ad inibire ulteriormente le ricombinazioni tra i cromosomi X e Y, assicurando quindi il mantenimento del dimorfismo dei due cromosomi sessuali e contemporaneamente conferendogli delle peculiari caratteristiche evolutive. Le zone di soppressione delle ricombinazioni tra i cromosomi sessuali sono state cruciali per lo sviluppo e la formazione di cromosomi sessuali e si sono verificate separatamente nei vari lineaggi all'interno del regno vegetale (Ruiz Rejón, 2004).

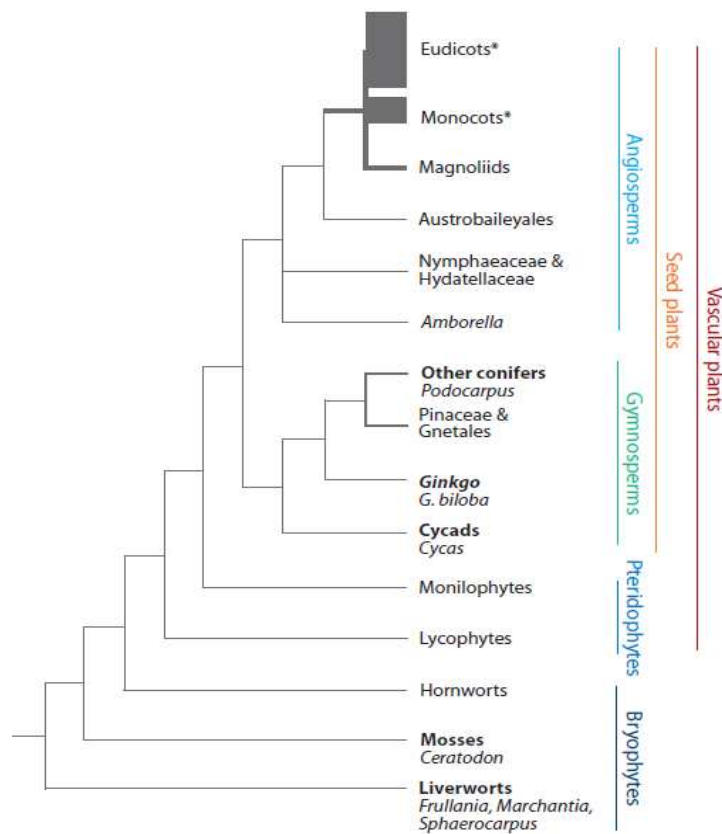


Figura 1.3. Distribuzione dei cromosomi sessuali nelle piante terrestri. Gli asterischi affianco a monocotiledoni e eucotiledoni si riferiscono alla presenza di cromosomi sessuali (Ming *et al.*, 2011).

Come si può notare dalla figura 1.3, la distribuzione filogenetica delle specie dioiche, è estremamente disomogenea:

- tra le epatiche il 75% ovvero 6000 sono specie dioiche (Wyatt e Anderson , 1984);
- tra i muschi il 50% o circa 7250 specie (Wyatt e Anderson, 1984);
- tra le antocerote, i lycopodi e le felci quasi nessuna specie;
- tra le Gimnosperme circa il 36% , che comprendono le 300 specie di *Cycas*, *Ginkgo biloba*, e le circa 80 *Gnetales*;
- solo il 6% circa delle Angiosperme, pari a 14.600 specie divise in 960 generi e 200 famiglie (Renner e Ricklefs, 1995).

1.3 Cromosomi sessuali nelle Gimnosperme

Tra le 1010 specie di Gimnosperme conosciute, sono stati identificati i cromosomi sessuali solo per sei specie (0.6%) provenienti da 3 famiglie differenti, le quali presentano tutti cromosomi sessuali eteromorfi (Ming *et al.*, 2011).

Tale caratterizzazione di eteromorfismo si basa principalmente sulla rilevazione di deboli satelliti situati al termine dei bracci dei cromosomi sessuali. Nel caso specifico, il cromosoma X evidenzia un satellite a livello di entrambe le estremità dei bracci cromosomici, mentre il cromosoma Y presenta un satellite ad una sola estremità. Ad esempio in *Cycas pectinata*, il cromosoma X mostra un debole satellite ad una estremità, del tutto assente invece sul cromosoma Y (Abraham e Mathew, 1962). Un'osservazione simile è stata riportata per Ginkgo, in un paio di brevi regioni subterminali (Lee, 1954; Pollock, 1957), ma questo dato è stato contestato da studi più recenti (Chen *et al.*, 1987; Lan *et al.*, 2008) (Fig.1.4).

Cycadaceae. Le piante femminili e maschili di *Cycas revoluta* hanno cromosomi eteromorfi distinti XY (Segawa *et al.*, 1971). Questa specie ha 10 paia di autosomi e un paio di cromosomi sessuali. Il cromosoma X è il quarto più grande cromosoma e il cromosoma Y il nono in ordine crescente di lunghezza.

Ginkgoaceae. In *Ginkgo biloba*, la ricerca dei cromosomi sessuali viene condotta da più di 50 anni. Le piante di Ginkgo maschio e femmina hanno 22 autosomi e una coppia di cromosomi sessuali ZW. Newcomer (1954) è stato il primo a riconoscere che i cromosomi sessuali sono i più grandi nel corredo cromosomico della specie e che presentano un dimorfismo sulla base della posizione del centromero: uno è metacentrico e l'altro sub metacentrico. Tuttavia, Newcomer aveva erroneamente ipotizzato un sistema del tipo XY, con il maschio eterogametico. Solo nel 1987 è stato riconosciuto in *G. biloba* un sistema ZW, caratterizzato da una femmina eterogametica (Chen *et al.*, 1987; Lan *et al.*, 2008).

Podocarpaceae. Le piante diploidi femminili e maschili di *Podocarpus macrophyllus* hanno un diverso numero di cromosomi con $2n = 38$ nelle femmine e $2n = 37$ nei maschi (Hizume, 1988). Tutti i 38 cromosomi nelle femmine sono telocentrici, mentre 36 cromosomi nei maschi sono telocentrici e il 37° è un grande cromosoma submetacentrico.

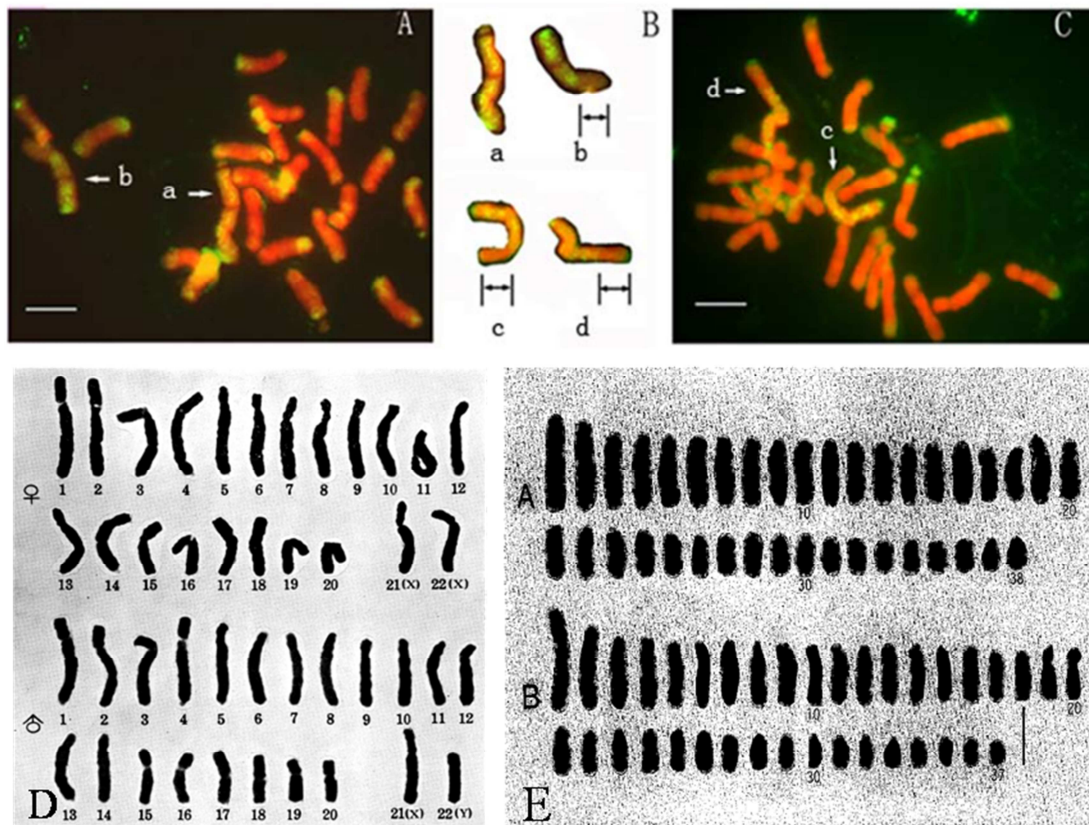


Figura 1.4. Immagini di cromosomi sessuali nelle Gimnosperme. **A-B-C** in *Ginkgo biloba*: A: metafase di un individuo femmina; B: dettaglio dei cromosomi sessuali con satelliti (a,b,c,d); C metafase di un individuo maschio. **D** in *Cycas revoluta*: in alto cariotipo di un individuo femmina, in basso cariotipo di un individuo maschio. In **E**: cariotipi di un individuo femmina $2n=38$ (in alto) e di un individuo maschio $2n=37$ (in basso) di *Podocarpus macrophyllus*. Scala= $5\mu\text{m}$.

1.4 Considerazioni conclusive sui sistemi sessuali nel regno vegetale

Come si è potuto notare da questo breve *excursus* sulla sessualità delle piante i cromosomi sessuali, così come l'unisessualità, sono comuni nel regno animale, ma meno frequenti nelle piante.

Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella funzione principale dei cromosomi sessuali ovvero quella di “rinforzare” il diocismo, un sistema sessuale che incrementa la possibilità di “*outcrossing*” in specie auto incompatibili (Charlesworth, 1985).

Le piante sono organismi sedentari, caratterizzati dalla presenza di una “*open architecture*” ovvero possiedono organi coinvolti nei processi riproduttivi esposti, per cui la loro crescita dipende al contempo da fattori intrinseci ed estrinseci. Inoltre sono frequenti meccanismi di autoimpollinazione e impollinazione ad opera di fiori solo spazialmente vicini, che tuttavia talvolta divengono necessari al fine di assicurare la riproduzione e quindi la sopravvivenza (Ming *et al.*, 2011).

Assodate tali considerazioni, si può facilmente comprendere che gli individui unisessuali del regno vegetale sono maggiormente soggetti a far fronte ad un altro rischio di fallimento riproduttivo, in particolar modo quando si trovano in una situazione di bassa densità di popolazione della specie in questione.

Una seconda spiegazione potrebbe risiedere nella frequenza di poliploidia nel regno vegetale. La condizione poliploide potrebbe prevenire l'evoluzione dei cromosomi sessuali dal momento che la frequenza di una omozigosi recessiva degli alleli, in quattro o otto cromosomi omologhi, è molto più bassa che in due cromosomi omologhi. (Westergaard, 1958).

È importante sottolineare infine che rispetto alla review del 1958 di Westergaard l'elenco delle piante con cromosomi sessuali è cresciuto solo leggermente, probabilmente perché ad oggi la citologia vegetale è una disciplina in contrazione. Ciò nonostante, nuovi dati citologici molecolari e studi genetici negli ultimi anni hanno contribuito a rilevare un discreto numero di nuove specie con cromosomi sessuali omomorfi; ma nel momento in cui il sequenziamento dei genomi diventerà una pratica di routine saranno sicuramente scoperte altre specie dioiche caratterizzate cromosomi sessuali.

Ming (2011) riporta infine due considerazioni conclusive sull'evoluzione dei cromosomi e delle strategie sessuali delle piante:

- se si definiscono cromosomi sessuali, quelle strutture aventi geni *sex-linked* (ovvero regioni strettamente coinvolte nella determinazione del sesso), allora si

potrebbe affermare che tutte le specie dioiche sono dotate di cromosomi sessuali, ma non tutte li possiedono eteromorfi. Nelle specie dioiche, in cui non vengono distinti morfologicamente, sarebbero quindi omomorfici.

Inoltre, considerando i diversi tempi di evoluzione dei cromosomi sessuali nel mondo vegetale ed il modello evolutivo riportato in precedenza, l'autore ipotizza che:

- specie dioiche che possiedono cromosomi sessuali al primo o secondo stadio evolutivo, ovvero caratterizzati da strutture recanti semplici regioni di soppressione ricombinazione tra i due geni *sex-linked*- potrebbero scegliere senza grosse difficoltà, di ripristinare la condizione sessuale di ermafroditismo o monoicismo se esse sono strategie sessuali è selettivamente vantaggiose in una particolare popolazione e l'ambiente.

Ciò che appare certo quindi è che la sessualità, nel mondo delle piante, si esplica in modo assai vario. L'importante è in ogni caso assicurare la sopravvivenza della specie e mantenere elevata la capacità di evoluzione, in seguito alle pressioni ambientali, che spesso impongono alla pianta risposte a stress, attivando appropriati adattamenti morfologici, fisiologici e molecolari (Cattivelli *et al.*, 2002; 2007).

2. Citogenetica forestale

Negli ultimi decenni si è sviluppato un notevole interesse verso la biologia molecolare e la genetica di molte specie forestali come conseguenza dell'importanza economica da esse acquisita. Sono stati condotti infatti diversi studi volti a conoscere i genomi e sequenze geniche di specie con noto valore commerciale quali querce, noccioli, pioppi, eucalipti e pini (Deveyet *et al.*, 1999; Sewell *et al.*, 1999; Barcaccia *et al.*, 2003; Barreneche *et al.*, 2004; Scalfi *et al.*, 2004; Poke *et al.*, 2005).

Ad oggi sono in atto ricerche specifiche mirate al sequenziamento di interi genomi di specie arboree, così come è già avvenuto per alcuni generi quale quello del pioppo (Tuskan *et al.*, 2006).

Pochi sono stati invece gli studi citogenetici volti a definire l'organizzazione fisica dei loro genomi.

Ciò risulta vero in particolar modo per le specie decidue, caratterizzate da piccoli genomi con un numero elevato di piccoli cromosomi.

Di conseguenza la maggior parte degli studi di citogenetica forestale sono stati effettuati su conifere, nelle quali le conoscenze genomiche delle specie sono state completate da studi cariotipici. La dimensione dei cromosomi di tali specie è infatti di molto maggiore (circa 10 μ) rispetto alle dimensioni medie dei cromosomi delle latifoglie (circa 5 μ) (Ribeiro *et al.*, 2008) e ciò facilita non poco le indagini.

Le ricerche citogenetiche effettuate sulle specie forestali comprendono la caratterizzazione dei cariotipi ed hanno il fine di comprenderne l'evoluzione e le relazioni filogenetiche. In questo contesto il ruolo dei geni di rDNA, ampiamente utilizzati nelle ricerche di citogenetica come sonda, ha contribuito notevolmente a caratterizzare diversi *patterns* tra le specie studiate (Ribeiro *et al.*, 2008).

Lo sviluppo della tecnica dell'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) ha segnato un traguardo importante negli studi citogenetici delle specie forestali, in quanto rappresenta uno strumento utile per l'identificazione delle coppie di omologhi, l'analisi, il mappaggio fisico dei genomi e gli studi evolutivi.

2.1 Ibridazione *in situ*: cenni preliminari

L'ibridazione *in situ* (ISH) permette la localizzazione in preparati citologici di DNA o RNA marcato, quindi di individuare la posizione fisica delle sequenze usate come sonda a livello cellulare o, dipendendo dal tipo di preparato e di sonda, a livello genomico od singolo cromosoma. In generale, più facile risulta rilevare DNA ripetuto, mentre più difficoltoso è il rilevamento di sequenze a copia unica o a basso numero di copie, specialmente in preparati vegetali.

Tale tecnica trova numerose applicazioni nel campo della citogenetica animale e vegetale, malgrado alcune caratteristiche del materiale vegetale, quali presenza di parete cellulare, maggiore condensazione dei cromosomi, difficoltà di sincronizzare il ciclo cellulare e quindi di accumulare cellule ad uno stadio determinato, rappresentino un ostacolo alla resa ottimale di tale tecnica. Per tali motivi l'ibridazione *in situ* ha avuto fin dall'inizio maggior successo su cellule animali, mentre il suo più ampio impiego nel campo della citogenetica vegetale è stato possibile solo di recente, in seguito alla messa a punto di miglioramenti metodologici che, come verrà descritto in seguito, hanno permesso, tra l'altro, una definizione molto più dettagliata, rispetto a tecniche classiche quali il bandeggio-C, delle caratteristiche di struttura e organizzazione di sequenze visualizzabili lungo l'asse longitudinale di un cromosoma.

Come per altri gruppi di specie, l'ibridazione *in situ* può avere diverse applicazioni nella citogenetica forestale:

- studi cariotipici;
- identificazione di bracci e regioni cromosomiche;
- identificazione di genomi;
- analisi di variazioni strutturali, quali delezioni, duplicazioni, traslocazioni, inversioni, ecc.;
- indagini sull'organizzazione genomica/cromosomica di sequenze ripetute;
- studio delle relazioni tra mappe fisiche e mappe genetiche inter-specie e inter-genere;
- studio dell'organizzazione nucleare della cromatina in diverse specie e ibridi di queste.

L'ibridazione *in situ* fu inizialmente sviluppata da Gall e Pardue (1969) ed indipendentemente da John *et al.* (1969), i quali utilizzarono sonde marcate con sostanze radioattive e l'autoradiografia come metodo di rilevamento. Negli anni '80 sono stati poi messi a punto sistemi di marcatura non radioattiva degli acidi nucleici, al fine di superare gli svantaggi dell'uso del radioattivo, quali la scarsa sicurezza, i lunghi tempi di esposizione e la bassa risoluzione del segnale emesso.

I più recenti sistemi di marcatura elaborati prevedono l'inserzione nel DNA della sequenza di interesse di un analogo di un nucleotide (spesso dUTP = deossi-uridin-trifosfato) legato ad una molecola, quale la biotina (vitamina H), la digossigenina (steroidi presente in natura nel genere *Digitalis*), oppure un fluorocromo. Per la visualizzazione della sequenza marcata, mentre quest'ultimo è direttamente rilevabile al microscopio dotato di opportuno dispositivo per fluorescenza, molecole non fluorescenti come biotina e digossigenina necessitano di una reazione immunocitochimica o enzimatica che le legghi ad un ulteriore composto. Questo può essere o una sostanza capace di dar luogo alla formazione di un precipitato colorato in corrispondenza della sequenza marcata, oppure un fluorocromo, di cui si osserverà la fluorescenza, come detto, in un microscopio idoneo. Il rilevamento enzimatico, basato sulla visualizzazione di un precipitato nella zona di ibridazione, presenta il vantaggio, rispetto al rilevamento tramite fluorescenza, di garantire un segnale stabile e di richiedere per lo studio dei preparati un semplice microscopio ottico; tra le caratteristiche negative ricordiamo la bassa risoluzione del segnale, a causa della tendenza del precipitato a diffondere e, soprattutto, l'impossibilità di evidenziare contemporaneamente più sonde.

Il sistema di rilevamento mediante fluorocromi, detto FISH (= *Fluorescence In Situ Hybridization*), è quello quasi esclusivamente utilizzando negli ultimi anni, dati i vantaggi ad esso legati: l'alta risoluzione del segnale, la possibilità di usare simultaneamente più sonde marcate e/o rivelate con fluorocromi diversi; la possibilità di sottoporre i preparati a più ibridazioni successive (reibridazione), o a diversi trattamenti, per esempio ibridazione e bandeggio-C.

In generale, la marcatura, e quindi rilevamento diretto, con un fluorocromo come la *fluoresceina isotiocianato* (FITC) o la *Cianina3* (Cy3), utilizzate nel presente progetto di ricerca, permette una semplificazione del protocollo e un conseguente risparmio di tempo.

2.2 Ibridazione *in situ* su cromosomi metafasici

Una sequenza di DNA può essere localizzata lungo cromosomi metafasici grazie alla complementarità delle basi fra la sonda e il bersaglio cromosomico. La sonda marcata viene denaturata incubandola ad alta temperatura e quindi posta su preparati cromosomici, consistenti in cellule somatiche trattate per ottenere un arresto del ciclo alla metafase (vedi Materiali e Metodi), il cui DNA è stato anch'esso denaturato al calore. Ad una temperatura adeguata, la sonda tenderà a rinaturare ricostituendo la doppia elica; la rinaturazione della sonda avviene anche con la sequenza omologa presente sui cromosomi. A questo punto si formerà un ibrido molecolare che sarà formato dal DNA cromosomico e dalla sonda marcata: il rilevamento, con adeguati sistemi, della sonda marcata identifica il sito di ibridazione sui cromosomi.

Preparati cromosomici ottenuti da qualsiasi specie animale o vegetale possono essere utilizzati nell'ibridazione *in situ*. Differenze sostanziali possono esistere nelle modalità di preparazione del materiale cromosomico, ottenibile da diversi tessuti (Fig.2.1).

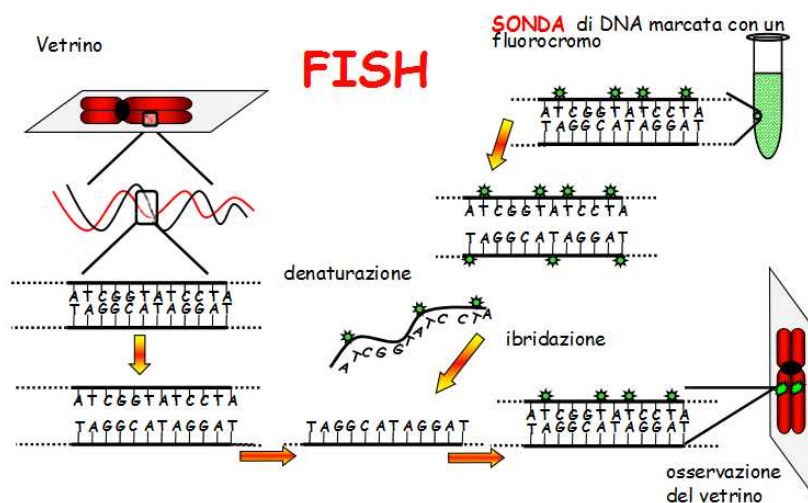


Figura 2.1. Schema della tecnica di ibridazione *in situ* fluorescente mediante sonda marcata con fluorocromo, su vetrini con preparati metafasici.

2.3 Marcatori molecolari come sonde

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile con sonde (=probe) o inneschi (=primer) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' (Barcaccia *et al.*, 2000).

Nella presente ricerca sono stati utilizzati diversi tipi di marcatori molecolari come sonde per gli esperimenti di ibridazione *in situ*: sequenze di DNA satellite altamente ripetuto, retrotrasposoni, microsatelliti o SSR e sequenze di rDNA.

Dna satellite altamente ripetuto

Il DNA non codificante comprende sequenze uniche o ripetute solo raramente e sequenze moderatamente o molto ripetitive (Bennett, 2000).

Al DNA ripetitivo appartiene il DNA satellite o TRS, *tandemly repetitive sequences*, costituito cioè da sequenze nucleotidiche che si ripetono appunto a tandem. Il nome di DNA satellite deriva dal fatto che, in base alla sua diversa densità, può essere separato dal restante DNA mediante particolari tecniche di centrifugazione (Klug e Cummings, 2000). I TRS sono ampiamente interspersi lungo tutto il genoma e sono polimorfici e spesso ad uno stesso locus il numero delle ripetizioni della sequenza può variare da un individuo all'altro; per queste proprietà i TRS sono utilizzati come marcatori per il *DNA profiling* e per la costruzione sia di mappe fisiche che di mappe di *linkage*.

Elementi trasponibili: i retrotrasposoni

Gli elementi trasponibili (TEs) sono componenti ubiquitari dei genomi vegetali (Flavell *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1997; Voytas *et al.*, 1992), spesso pari al 50% di tutto il DNA (Pearce *et al.*, 1996). I TEs sono capaci di muoversi nel genoma da una posizione ad un'altra e di inserire proprie copie in nuovi siti cromosomici. Anche se il ruolo di questi elementi non è ancora del tutto chiarito, il loro impatto nell'organizzazione del genoma e nei riarrangiamenti cromosomici sembra considerevole (Friesen, 2001). Gli elementi trasponibili vengono classificati in base alla loro struttura ed al meccanismo di trasposizione. In base a ciò è possibile suddividerli in trasposoni di Classe I e Classe II (Berg e Howe, 1989). Tra gli elementi di Classe I, ritrovati solamente negli eucarioti e molti dei quali caratterizzati dalla presenza di lunghe estremità ripetute (LTR),

traspongono nel genoma tramite un intermedio a RNA, a sua volta retro-trascritto nel DNA dalla trascrittasi inversa e conseguentemente si replicano in diverse posizioni all'interno del genoma. Pertanto i TEs della Classe I sono noti anche come retrotrasposoni.

In base alla loro struttura i retrotrasposoni sono divisi in due gruppi: quelli che sono affiancati da lunghe ripetizioni terminali (LTR), e retrotrasposoninon-LTR. I retrotrasposoni LTR possiedono alle estremità sequenze ripetute, lunghe dalle 100 alle 5000 coppie di basi. Sono suddivisi a loro volta in due gruppi, i retrotrasposoni Ty1-copia simili (*copia-like*) e i retrotrasposoni Ty3-gypsy simili (*gypsy-like*), in base alle loro sequenze genomiche e all'ordine dei geni codificati. Entrambi i gruppi si ritrovano in gran numero sia nelle piante (dalle più semplici alghe unicellulari fino alle Angiosperme) che nei mammiferi, compreso l'uomo, di cui costituiscono approssimativamente l'8% dell'intero genoma (Friesen, 2001).

Gli elementi di Classe II, DNA-trasposoni, costituiscono una classe di TEs molto eterogenea, ritrovati in tutti i viventi. La peculiarità di questi elementi è la presenza alle loro estremità di ripetizioni terminali invertite (dette TIR, dall'inglese *Terminal Inverted Repeats*), sequenze di lunghezza variabile (10-80bp).

Nelle piante, sono stati disegnati *primers* degenerati per amplificare questi domini mediante PCR rilevando la loro distribuzione anche nelle specie arboree. La caratterizzazione del contenuto e della variabilità dei retrotrasposoni nei diversi taxa vegetali, rappresenta un importante contributo alla comprensione della organizzazione dei genomi vegetali e della loro evoluzione (Friesen *et al.*, 2001).

Microsatelliti (SSR)

Con il termine micro satelliti o SSR (acronimo di *Simple Sequence Repeat*) vengono indicate le regioni di DNA caratterizzate da sequenze ripetute molto semplici, cioè oligonucleotidi di 2-6bp – tipo (CA)_n, (GCC)_n, (GATA)_n (Tautz, 1988; Morgante e Olivieri, 1993; Bell e Ecker, 1994). Le ripetizioni di nucleotidi che negli eucarioti sono molto comuni e sono altamente polimorfiche. La ripetizione AT è la più frequente nelle piante, mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione (AC)_n. È stato stimato che esiste, in media, una regione SSR ogni 50-750 Kb, in funzione del tipo di motivo ripetuto.

Questi marcatori possono essere suddivisi in perfetti, quando sono costituiti da una sequenza ininterrotta di ripetizioni dello stesso motivo di base, imperfetti, quando la sequenza ripetuta risulta interrotta da una o più sequenze non ripetute, e composti, quando

sono costituiti da una sequenza di ripetizioni perfetta o imperfetta adiacente ad una seconda sequenza di ripetizioni con diverso motivo di base.

Il numero di ripetizioni del motivo di base del microsatellite è molto variabile, determinando il polimorfismo tra individui, mentre le regioni fiancheggianti dove sono disegnati i *primers* che permettono il rilevamento di tali ripetizioni, sono conservate.

Gli SSR sono una classe di marcatori molecolari molto diffusi e interspersi nel genoma,; essi presentano un elevato livello di variabilità all'interno di ciascuna specie difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, il che li rende un ottimo strumento per il *fingerprinting*, la caratterizzazione genetica, le analisi forensi e di parentela nonché per il miglioramento genetico.

Sequenze rDNA

La principale classe degli rDNA comprende i geni che codificano per il 18S, 5,8S e per il 28S rRNA, anche definito 35S o 45S, che sono correlati agli organizzatori della regione nucleolare (NORs) (Long e David, 1980). La seconda famiglia ribosomiale è formata dall'rDNA che codifica per il 5S rRNA. Il 5S rDNA consiste di copie multiple di una sequenza altamente conservata di 120 coppie di basi separata da una regione variabile che è uno spaziatore non trascritto (=NTS)(Long e David, 1980).

Le regioni trascritte interne (ITS-1 e ITS-2) che separano i geni ribosomiali del 18S dal 28S sono considerati degli ottimi candidati per valutare le distanze filogenetiche all'interno dei generi o tra gruppi di specie affini. Infatti, mentre le regioni del 18S e del 28S sono molto conservate lungo le varie linee filetiche, gli spaziatori interni (ITS-1 e ITS-2) e lo spaziatore intergenico (IGS) variano tra le specie e l'allineamento delle loro sequenze viene normalmente utilizzato per indagini filogenetiche. Le regioni ITS, quindi, sono più variabili di quelle dei geni funzionali del 18S, 5,8S e 28S ma sono più conservate di quelle dell' IGS (Baldwin *et al.*, 1995). Le caratteristiche di tali sequenze permettono, di norma, una facile amplificazione via PCR, mediante l'uso di *primer* quasi universali, che riescono a fornire prodotti di amplificazione sequenziabili dalle alghe verdi alle monocotiledoni. La sequenza nucleotidica e la posizione di queste due famiglie multigeniche ha contribuito alla conoscenza della struttura, organizzazione ed evoluzione di diversi genomi.

I geni codificanti per le sub unità ribosomiali del 45S rDNA e del 5S rDNA sono infatti i marcatori maggiormente utilizzati negli esperimenti di FISH, grazie all'elevato grado di conservazione delle sequenze geniche e alla loro natura a tandem, che li rende facilmente identificabili in un ampio numero di specie.

Nelle specie forestali decidue ogni unità varia dai 6 alle 13 kb (Zimmer *et al.*, 1988; Bellarosa *et al.*, 1990) e da circa 27-40 kb nelle conifere (Bobola *et al.*, 1992; Karvonen *et al.*, 1993); le variazioni vanno attribuite alla lunghezza dell'IGS (Rogers e Bendich, 1987; Beech e Strobeck, 1993).

Le centinaia di migliaia di copie di tali unità ripetute, eventualmente presenti in un locus cromosomico (identificabile tramite FISH con un forte segnale fluorescente) possono rappresentare una grande porzione del genoma, come ad esempio in *Arabidopsis* ne occupano l'8% (Pruitt e Meyerowitz, 1986).

Le sub unità del 45S e 5S, che si presentano negli eucarioti come unità a tandem indipendenti, possono presentarsi associati fisicamente sullo stesso cromosoma (modello *L-type*) o separati su cromosomi differenti (modello *S-type*) ed essere caratterizzati da uno più loci cromosomici (Wicke *et al.*, 2011); pertanto la loro posizione rappresenta un marcatore utile per l'identificazione cromosomica (Doudrick *et al.*, 1995).

Cambiamenti nella distribuzione cromosomica di tali unità sono generalmente correlati con i tassi di speciazione e sono stati utilizzati negli studi evolutivi, come ad esempio nelle *Triticeae* (Castilho e Heslop-Harrison, 1995; de Bustos *et al.*, 1996; Taketa *et al.*, 1999).

La conoscenza dei genomi delle conifere, per la maggior parte dei casi organizzati in cromosomi metacentrici di dimensioni simili, è stata notevolmente migliorata ed implementata grazie all'utilizzo della tecnica della "rDNA FISH" (Hizume *et al.*, 2002; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2002; Vischi *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2006).

I loci di rDNA sono stati localizzati nei cromosomi di diverse specie nelle seguenti famiglie di Gimnosperme: *Pinaceae*, *Podocarpaceae*, *Cupressaceae* e *Zamiaceae* sono descritti in dettaglio in Tabella 2.1.

Il genere maggiormente studiato fino ad ora è stato *Pinus*, nel quale è stato effettuato un confronto intra-genere tra cariotipi di venti specie che ha rivelato una grande variazione nella distribuzione dei loci di rDNA, specialmente della sub unità 45S. Tale particolare variabilità si contrappone tuttavia ad altre caratteristiche, quali il numero cromosomico e la morfologia dei cromosomi, che, al contrario, sono fortemente conservate tra le diverse specie analizzate (Cai *et al.*, 2006). Ciò è altrettanto valido anche per le specie di *Picea* (Vischi *et al.*, 2003).

In generale si può affermare che il locus del 5S rDNA mostra un'eterogeneità di *pattern* simile tra specie forestali appartenenti alle Gimnosperme e alle Angiosperme, mostrando un segnale che si ritrova in entrambe le divisioni su un minimo di uno fino a quattro

cromosomi - sei solo in casi sporadici (Vaio *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006). Sempre nelle specie forestali, i loci cromosomici del 45S rDNA variano invece da sette a dieci nelle Gimnosperme (Cai *et al.*, 2006) e da uno a nove nelle Angiosperme (Pedrosa-Harand *et al.*, 2006).

È necessario comunque sottolineare che sono presenti pochi studi citogenetici in letteratura effettuati mediante FISH su specie forestali decidue; nonostante ciò i lavori realizzati sui generi *Betula* e *Populus* (Prado *et al.*, 1996; Ananthawat-Jónsson, 2004) rappresentano un riferimento bibliografico fondamentale. Infatti in queste pubblicazioni, si dimostrano i vantaggi di utilizzare alcune tecniche di preparazione cromosomica in Angiosperme forestali, in cui la cariotipizzazione risulta difficile a causa della dimensione molto piccola dei cromosomi.

Nonostante i passi avanti conseguiti tramite lo sviluppo di nuove tecniche citomolecolari, sono necessari ancora ulteriori progressi nell'ambito dello studio dei cariotipi di specie arboree per effettuare un'identificazione dei cromosomi e stabilire relazioni tra cariotipi tramite analisi comparative.

Uno dei primi lavori eseguiti con questo scopo, è stato realizzato mediante un'analisi comparativa nel genere *Quercus*, tramite uno screening dei loci del 5S e 45S rDNA utilizzando la FISH (Zoldos *et al.*, 1999). Questo studio ha rilevato un elevato grado di conservazione intra-genere, risultando tutte le specie portatrici di una coppia di segnali paracentromerici per il 5S e di due coppie di segnali del 45S (i loci del 5S e 45S si trovavano su cromosomi differenti).

Ad oggi i loci del 45S sono stati mappati anche in *Populus nigra* (due segnali in posizione terminale) su cromosomi distinti da quelli portatori del 5S rDNA (un locus terminale) (Ribeiro *et al.*, 2008). Un analogo numero e posizione dei loci di rDNA è stato individuato in *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006), suggerendo un elevato grado di conservazione, relativamente alla posizione di questi geni, durante l'evoluzione del genere *Populus*.

Prado in un articolo del 1996 ha riportato la conservazione del locus del 5S rDNA e la variazione dei loci del 45S rDNA tra cinque specie di *Populus* (da un paio in *P. alba*, due paia in *P. nigra* e *P. deltoides*, e tre paia in *P. balsamifera* e *P. euroamericana*).

Tuttavia, la caratterizzazione dei loci di rDNA tra le cinque specie di *Populus* descritta da Prado, è stata realizzata principalmente in cellule in interfase e in poche cellule in metafase mitotica, che tuttavia presentavano un elevato grado di sovrapposizione dei cromosomi. L'analisi dei loci di rDNA in nuclei interfasicci può condurre ad un'erronea

interpretazione dei dati, poiché tali domini attivi trascrizionalmente potrebbero presentare un alto grado di variabilità dei *patterns* a seconda dell'organizzazione della cromatina (Morais-Cecílio *et al.*, 2000; Caperta *et al.*, 2002).

Comunque, la descrizione dei segnali forniti dall'rDNA non è sempre sufficiente per l'identificazione di tutte le paia di cromosomi omologhi. La sua efficacia dipende dal numero di loci di rDNA presenti nel genoma in relazione al numero totale dei cromosomi, e dalla variazione nei loro *patterns* e distribuzione sui cromosomi.

Pertanto la tecnica della FISH viene spesso condotta utilizzando assieme anche altri marcatori citologici, come il bandeggi cromosomici effettuati con fluorocromi come la cromomicina A3 (CMA) e il 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), che ibridano rispettivamente sulle regioni ricche di GC e AT (Schweizer, 1976), o avvelendosi di specifiche sequenze di DNA altamente ripetute. Ad esempio, sono stati realizzati studi cariotipici combinando la tecnica della rDNA FISH con il bandeggio cromosomico in *Pinus elliottii* (Doudrick *et al.*, 1995), in due *Abies alba* (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2002), e in undici querce europee e americane (Zoldos *et al.*, 1999).

Il bandeggio cromosomico risulta essere uno strumento talvolta utile per l'identificazione cromosomica, ma può rivelare anche piuttosto macchinoso e dispendioso come procedimento (Hizume *et al.*, 2002). Invece, l'utilizzo di altre sequenze di DNA altamente ripetute come marcatori, assieme alle sonde di rDNA, può costituire un'alternativa migliore per l'identificazione dei cromosomi.

Inoltre sono state condotte con successo delle comparazioni intrageniche tra cariotipi utilizzando sonde di rDNA in associazione con altre sequenze ripetute a tandem (Hizume *et al.*, 2002; Vischi *et al.*, 2003; Islam-Faridi *et al.*, 2007). Nello specifico, sono stati identificati i cariotipi di *Pinus thunbergii*, *Pinus nigra* (Hizume *et al.*, 2002), e *Pinus taeda* (Islam-Faridi *et al.*, 2007) utilizzando la FISH con la “telomere-repeat-sequence”. Essa è una sonda telomero-specifica la quale deriva dalle sequenze di *Arabidopsis*, che nelle specie di pino in questione ibrida non solo con sequenze telomeriche ma anche in posizioni interstiziali e domini centromerici (Fuchs *et al.*, 1995; Hizume *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2005). Tali sequenze corrispondono con il bandeggio positivo con il DAPI e quindi con le regioni ricche in AT (Schmidt *et al.*, 2000; Hizume *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2005).

Diversamente nelle Angiosperme forestali, le sequenze telomero-specifiche sono confinate alle estremità dei cromosomi (Tuskan *et al.*, 2006).

Anche altre sequenze ripetute, come le sequenze centromero-specifiche, hanno mostrato un *pattern* variabile tra le specie di *Pinus* e *Picea* (Hizume *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 1998; Vischi *et al.*, 2003).

Le analisi citogenetiche assieme agli strumenti molecolari idonei possono contribuire a rivelare in modo inequivocabile le differenze tra le specie, identificando eventi (ad es. traslocazioni) che sono difficili da riconoscere attraverso l'utilizzo esclusivo di un approccio molecolare.

In conclusione si può affermare che un'accurata ricerca citogenetica nella quale sono combinati i dati genetici e cromosomici, rappresenta uno strumento utile per effettuare confronti ed inferenze sull'evoluzione delle specie forestali.

2.4 Progetti di sequenziamento e database

Come riportato fino ad ora, ad oggi sono stati condotti diversi studi molecolari sugli alberi forestali, sia nelle Gimnosperme che nelle Angiosperme.

Tra le specie decidue vi sono genomi completamente sequenziali, come quello dell'organismo modello *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006). Invece, a causa delle dimensioni notevoli del loro genoma, le Gimnosperme forestali non sono state ancora completamente sequenziale, sebbene esistano diversi consorzi elencati di seguito che sono nati allo scopo di perseguire questo obiettivo:

'The Loblolly Pine Genome Project' (<http://dendrome.ucdavis.edu/lpgp/>);

'The ConiferGenome Project' (<http://www.pinegenomeorg/cgp/>);

'Sequoia SempervirensGenome Project' (<http://dendrome.ucdavis.edu/ssgp/>);

'White Pine Genome Project' (<http://dendrome.ucdavis.edu/wpgp/>).

Plant DNA C-values database

In rete è disponibile all'indirizzo <http://www.kew.org/cval/homepage.html> il *Plant DNA C-values Database* (release 6.0, December 2012), (Murray *et al.*, 2004). che comprende 186 specie di Gimnosperme appartenenti a 53 generi e 57 specie di Angiosperme appartenenti a 37 generi tra le specie forestali, per le quali viene riportato il numero cromosomico e il contenuto in DNA (in Mb) per set aploide (nella figura 2.2 si riporta la pagina iniziale del sito in questione). Questo portale rappresenta un utile strumento per effettuare un generale confronto tra gli assetti cromosomici delle specie forestali.

Difatti in questa banca dati sono incluse famiglie di Angiosperme con uno spiccato interesse economico e commerciale come *Fagaceae*, *Salicaceae*, *Betulaceae*, *Ulmaceae*, *Moraceae*, *Aquifoliaceae* e *Oleaceae*.

Tra le Gimnosperme invece sono incluse specie con un lento tasso evolutivo e che richiedono diversi anni per completare il loro ciclo vitale. La maggior parte di esse possiede grandi genomi, con una media di contenuto di DNA (1C-value) pari a di 18,536 Mb, distribuito in un numero aploide relativamente esiguo di lunghi cromosomi che solitamente corrisponde a 12 ($n=12$).

Plant DNA C-values Database

(release 6.0, December 2012)

MD Bennett and IJ Leitch

News

Release of new data for over 1400 species not previously listed. [More details](#)



The DNA amount in the unreplicated gametic nucleus of an organism is referred to as its C-value, irrespective of the ploidy level of the taxon. The Plant DNA C-values Database currently contains data for 8510 plant species. It combines data from the Angiosperm DNA C-values Database (release 8.0, Dec 2012), Gymnosperm DNA C-values Database (release 5.0, Dec. 2012), the Pteridophyte DNA C-values Database (release 5.0, Dec. 2012), the Bryophyte DNA C-values Database (release 3.0, Dec. 2010), together with Algae DNA C-values database (release 1.0, Dec. 2004).

We are extremely grateful to Emmeline Johnston for her help in entering the new data into the database

If you have comments and/or suggestions contact dnac-value@kew.org

Figura 2.2. Pagina iniziale del portale “Plant DNA C-values Database”, sito internet <http://www.kew.org/cval/homepage.html>.

Le Angiosperme forestali invece possiedono genomi più piccoli (con un 1C-value di 788 Mb), di circa venti volte inferiori a quelli delle Gimnosperme, distribuiti in una media di 28 cromosomi (circa il doppio del set cromosomico aploide di una Gimnosperma). Ciò implica l’esistenza di un grande numero di piccoli cromosomi nelle Angiosperme, che rappresenta un fattore limitante per gli studi citogenetici.

In sintesi, vi è una considerevole eterogeneità tra le specie forestali per quanto riguarda il numero cromosomico. Il numero di base (n) varia da 6 a 23 per le Angiosperme (Wright, 1976) e da 9 a 19 per le Gimnosperme (Khoshoo, 1961). Le conifere sono caratterizzate in genere da lunghi cromosomi e poca variabilità nel numero cromosomico, presentando un numero cromosomico di base di $n=11$ o $n=12$. Tutte le *Pinacea* e, che comprendono le specie di pini commercialmente più importanti, possiedono un corredo diploide di

cromosomi pari a $2n = 24$, fatta eccezione per la *Duglasia costiera* (*Pseudotsuga menziesii*) che possiede un corredo diploide con $2n = 26$ (Khoshoo, 1961; Wright, 1976).

Le differenze tra la dimensione dei genomi delle specie arboree appartenenti rispettivamente alle Angiosperme e Gimnosperme sono così elevate che un cromosoma di *Ginkgo biloba*, con un contenuto di DNA di 813 Mb rappresenta più dell'intero genoma di una specie decidua come *Fagus sylvatica*, la cui dimensione del genoma corrisponde a 544 Mb. Tale differenze di dimensioni sono direttamente correlate con la quantità di DNA ripetuto presente nei genomi, costituito soprattutto da elementi trasponibili e sequenze non geniche ripetute a tandem. La maggior parte di essi è rappresentata dai retrotrasposoni che hanno invaso i genomi in periodi differenti ed ora ne rappresentano la componente più abbondante (Zhang e Wessler, 2004), come ad esempio è noto in *Populus* (Tuskan *et al.*, 2006). Tali sequenze sono spesso disperse lungo i cromosomi, senza mostrare dei siti preferenziali. D'altra parte, le sequenze di DNA altamente ripetute tendono ad adottare un'organizzazione permanente durante il ciclo cellulare, incrementando la frazione di etero cromatina del genoma, mentre le frazioni codificanti solitamente appaiono decondensate come eucromatina (Ribeiro *et al.*, 2008). I genomi più grandi tendono a concentrare le frazioni di eterocromatina nelle regioni subtelomeriche, o in posizioni interstiziali dei bracci cromosomici (MacPherson e Filion, 1981; Jacobs *et al.*, 2000; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2002); diversamente i piccoli genomi sono caratterizzati dal possedere grandi blocchi di eterocromatina nelle regioni pericentromeriche, come ad esempio avviene in *Populus* (Ohri e Ahuja, 1991; Tuskan *et al.*, 2006).

La dimensione del genoma differisce inoltre al variare della ploidia, un processo comune in diverse piante che presentano l'assetto cromosomico duplicato rispetto a quello di specie diploidi (auto-poliploidia) o più assetti cromosomici derivanti da specie diverse (allo-poliploidia).

La poliploidia potenzia la diversità genetica aumentando il numero di cromosomi e sequenze di DNA e contemporaneamente permette la creazione di nuove mutazioni contribuendo all'adattamento di una specie vegetale a nuove situazioni ambientali.

Tale condizione è raramente osservata nelle Gimnosperme forestali, eccetto per l'esaploide *Sequoia sempervirens* ($2n = 6x = 66$) (Rogers, 1997; Ahuja e Neale, 2002), nel tetraploide appartenente alle Cupressaceae *Fitzroya cupressoides* (Hair, 1968), ed la specie tetraploide *Juniperus chinensis pfitzeriana* ($2n = 4x = 44$), (Ahuja, 2005).

Al contrario, tra le specie forestali appartenenti alle Angiosperme si ritrovano più specie poliploidi, ad esempio sono esaploidi alcuni membri della famiglie delle *Salicaceae*,

Betulaceae, *Ulmaceae*, *Aquifoliaceae* e *Aceraceae* (Bennett *et al.*, 1982; Clausen *et al.*, 1982; Barral *et al.*, 1995; Ananthawat-Jónsson e Thórsson, 2003; Barcaccia *et al.*, 2003.). Altri specie poliploidi sono state indotte artificialmente sia in Gimnosperme (Ahuja, 2005) che in Angiosperme (Särkilahti, 1988; Blakesley *et al.*, 2002), al fine di produrre alberi resistenti ed adattabili a situazioni edafoclimatiche sfavorevoli.

Plant rDNA database

Il PlantrDNA database (Garcia *et al.*, 2011. Release 1.0 <http://www.plantrdnadatabase.com>) è una risorsa online che fornisce informazioni su quasi 1200 specie di piante, circa il numero e la posizione sui cromosomi di segnali di DNA ribosomiale. I dati sono stati ottenuti da più di 300 pubblicazioni di citogenetica molecolare. Nella maggior parte di queste è stata utilizzata la tecnica FISH per localizzare i geni per l'RNA ribosomiale 18S-5.8S-26S e il 5S. Il database *PlantrDNA* comprende anche dati sul livello di ploidia, numero di cromosomi, dimensione media del genoma (2C in pg, vedi sopra) e il ciclo di vita della specie studiata.



release 1.0.2011

Searching: *Picea abies* Showing blocks of records. Total of records: 3

	Genus	Specific epithet	5S	5S P	35S	35S P	2n	Ploidy level	Arrangement	Ref.
1	<i>Picea</i>	<i>abies</i>	4		12	interstitial	24	2	separated	294
2	<i>Picea</i>	<i>abies</i>	2	interstitial	12	interstitial	24	2	separated	296
3	<i>Picea</i>	<i>abies</i>	4	interstitial	12	interstitial	24	2	separated	307

Figura 2.3 Esempio di una ricerca effettuata sul portale “*Plant rDNA database*”.

Le opzioni di ricerca avanzata sono svariate e comprendono il numero e la posizione dei segnali 5S e 35S, la presenza di una disposizione 5S-35S *linked* o *separated*, ed il relativo riferimento bibliografico.

Attualmente la banca dati comprende i dati di Angiosperme, Gimnosperme e Briofite già pubblicati o in corso di stampa. Gli aggiornamenti del database sono previsti una o due volte l'anno a seconda della quantità di dati di citogenetica molecolare generati dalla comunità scientifica.

Tabella 1.1 Organizzazione dell'rDNA nelle Gimnosperme (fonte www.plantrdnadatabase.com; Garcia *et al.*, 2012b). Le specie sono suddivise per ordine/famiglia. Sono riportati il numero totale di rDNA; il numero cromosomico diploide (2n); il numero dei loci della sub unità 5S e della sub unità 35S (Range 5S-35S); le loro posizioni (5SP;35SP); l'organizzazione delle due sub unità sullo stesso cromosoma (associata) o su cromosomi diversi (separata); i riferimenti bibliografici.

Ordine-famiglia	Loci rDNA totali	2n	Range 5S	5S P	Range 35S	35S P	Organizzazione	Riferimenti bibliografici
Coniferales (Pinophyta)								
Pinaceae								
<i>Abies</i>	14	24	4	interstiziale	10	interstiziale	separata	Puizina <i>et al.</i> , 2008.
<i>Larix</i>	6 - 8	24	2	(sub-) terminale o satellitare	4 - 6	Interstiziale	separata	Lubaretz <i>et al.</i> 1996; Liu <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2010.
<i>Picea</i>	10 - 18	24	2 - 4	interstiziale	8 - 14	Interstiziale(sub-) terminale o satellitare	separata	Shibata e Hizume, 2008; Lubaretz <i>et al.</i> , 1996; Siljak-Yakovlev <i>et al.</i> , 2002; Hizume <i>et al.</i> , 1999; Brown e Carlson, 1997;
<i>Pinus</i>	10 - 34	24	2 - 6	interstiziale -(sub-) terminale o satellitare	8 - 30	Interstiziale	separata	Islam-Faridi <i>et al.</i> , 2007; Hizume <i>et al.</i> , 2002; Cai <i>et al.</i> , 2006; Karvonen <i>et al.</i> , 1993; Cullis <i>et al.</i> , 1988; Bogunic <i>et al.</i> , 2011; Doudrick <i>et al.</i> , 1995; Liu <i>et al.</i> , 2003.
<i>Pseudotsuga</i>	14	24	2	interstiziale	12	Interstiziale	separata	Hizume e Akiyama, 1992; Amarasinghe e Carlson, 1998.
Coniferales (non-Pinaceae Pinophyta o Cupressophytes)								
Cupressaceae								
<i>Cryptomeria</i>	8	22	4	(sub-) terminale o satellitare	4	(sub-) terminale o satellitare	associata	Hizume <i>et al.</i> , 1999.
<i>Cunninghamia</i>	4	22	2	(sub-) terminal o satellitare	2	(sub-) terminal o satellitare	associata	Hizume <i>et al.</i> , 1999.
<i>Juniperus</i>	4 - 8	22	2 - 4	interstiziale	2 - 4	(peri-) centromerica	separata	Nagano <i>et al.</i> , 2007.
Podocarpaceae								
<i>Podocarpus</i>	2 - 6	34 - 38	2 - 6	(sub-) terminale o satellitare	4 - 12	(sub-) terminale o satellitare	?	Murray <i>et al.</i> , 2002.
Zamiaceae								
<i>Ceratozamia</i>	10	16	2	(sub-) terminale o satellitare	8	(sub-) terminale o satellitare	separata	Tagashira <i>et al.</i> , 2001.
<i>Zamia</i>	8 - 22	16 - 23	2	(sub-) terminale o satellitare	6 - 20	(peri-) centromerico	separata	Tagashira <i>et al.</i> , 2001.
<i>Ginkgo</i>	5 - 8	24	1 - 4	(sub) terminale o satellitare	4	(sub-) terminale o satellitare	associata ?	Nakao <i>et al.</i> , 2005; Hizume <i>et al.</i> , 1999.

3. *Taxus baccata* L.

Il genere *Taxus* risale al Giurassico superiore (circa 140 milioni di anni fa), e la specie *Taxus baccata* si stima sia comparsa 15 milioni di anni fa. Questa osservazione contribuisce a considerare il tasso come una delle specie arboree più antiche d'Europa. La sua conservazione, permessa fino ai nostri giorni, ne dimostra la sua notevole capacità di adattamento (Hageneder, 2007).

Il tasso si presenta come albero a crescita mono o polipodiale, come un cespuglio o, in alta quota si ritrova anche come rampicante. Le sue straordinarie capacità di riproduzione vegetativa, l'emissione di polloni, la capacità di ricrescere da talee e la crescita avventizia di rami verticali sono tutti aspetti che esprimono una strategia ecologica quasi unica che si differenzia notevolmente da quasi tutti le altre specie forestali europee (Hageneder, 2007).

Un'indagine delle strategie ecologiche della posizione fitosociologia del genere, afferisce al *Taxus* un ruolo caratteristico di 'triple intermediary' -triplo intermediario-: ovvero, in una tipica successione ecologica il tasso occupa una posizione intermedia tra le specie pioniere (le prime piante che colonizzano ambienti in condizioni estreme particolari o rimaneggiati) e le specie climax (cioè le specie che dominano la fase finale di una successione ecologica) (Leuthold, 1998). Perciò da una parte, il tasso si colloca filogeneticamente tra le specie forestali più antiche d'Europa, ma a causa della sua straordinaria dinamicità, può essere al contempo considerata la più giovane. Tutti questi fattori sostengono l'appellativo assegnato al tasso da Leuthold (1998) che lo definisce 'albero archetipo d'Europa'.

3.1 Areale e inquadramento sistematico

Areale. *T. baccata* ha un areale molto vasto. In Europa lo troviamo fino al 60° parallelo nord e al 30° meridiano est; si ritrova poi anche in Marocco, Algeria, Iran settentrionale, Caucaso e Asia Minore, particolare che lo fa appartenere al tipo corologico “paleo temperato” che comprende le specie eurasiatiche sensu lato, cioè quelle specie che compaiono anche nel Nord Africa. È la specie che presenta uno degli areali più ampi in senso latitudinale fra tutte le specie legnose europee, superato solo da *Betula alba* e da *Populus tremula*. In Scandinavia raggiunge il “limes norrlandicus”, cioè l'estremo limite settentrionale di diffusione delle specie nemorali delle foreste caducifoglie temperate. Il limite orientale europeo è rappresentato dai Carpazi, mentre più a sud lo troviamo sulle coste del Mar Nero e nel Caucaso, fino alle coste occidentali del Mar Caspio. Limite occidentale è, invece, dato da Irlanda e Scozia; nelle isole britanniche si trova anche nelle isole Ebridi e Orcadi.

In Italia è segnalato lungo l'intero arco alpino e appenninico, fino alla fascia mediterranea, sebbene con areale molto frammentato e nelle isole del Mediterraneo si ritrova in Sicilia, Sardegna, Corsica, Isola d'Elba e Baleari. In Italia centrale si segnalano i popolamenti dei Monti Lepini, Bosco Martese nella catena dei Monti della Laga, Terminillo, Simbruini (Camerata Vecchia, Civita d'Antino, Morino), nella Marsica, Vallone Santa Margherita nel versante nord del monte Genzana, sui Frentani, Monti Pizzi. Meritano inoltre di essere ricordati i nuclei della Sardegna (Sos Niberos), della Sicilia (Nebrodi), della Garfagnana e del Gargano. Non vanno poi dimenticate le segnalazioni di piante singole o areali puntiformi in tutta Europa, apparentemente spontanei, ma di cui non si può escludere un'origine antropica, considerando l'utilizzo del tasso come pianta ornamentale.

In alcuni paesi, *T. baccata* è incluso nel “Red book” delle specie minacciate di estinzione (ad esempio in Repubblica Ceca, Slovacchia, Bulgaria, Romania, Russia, Iran), e in molti paesi è oggetto di programmi di conservazione naturale (ad esempio, Germania, Austria, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Romania, Russia), anche se secondo diverse misure. In Italia, ad esempio, sono protetti a livello nazionale solo i singoli alberi monumentali, ma nella maggior parte delle regioni è sottoposto ad una gestione speciale che prevede la protezione della specie a livello regionale, secondo le indicazioni della rete Natura 2000; ad esempio faggete con *Taxus* e *Ilex* sono ritenuti siti protetti in quanto considerati SIC= Siti di Importanza Comunitaria (comunicazione personale Prof. B. Schirone).

Inquadramento sistematico. Nell'inquadramento sistematico attualmente riconosciuto secondo Linea, il tasso si colloca nella famiglia delle *Taxaceae*, sottodivisione delle *Coniferophytina*, classe *Pinatae*, ordine *Pinales*. In passato le *Taxaceae* si collocavano in un ordine distinto, le *Taxales* (Florin, 1948), sistemazione venuta meno grazie alle evidenze genetiche che hanno appurato come queste siano in effetti monofiletiche con altre conifere (Cheng *et al.*, 2000).

La famiglia delle *Taxaceae* è composta da quattro (Gellini *et al.*, 1996) o cinque generi (Cope, The Botanical Review, 1998), quasi tutti situati nell'emisfero boreale, ad eccezione del monospecifico genere *Austrotaxus* Compton, endemico della Nuova Caledonia e della var. *mairei* del *Taxus chinensis* presente nell'Arcipelago malese.

Gli altri generi sono: *Pseudotaxus* W.C.Cheng (= *Nothotaxus* Florin) diffuso in Cina, *Torreya* Arn. con 6 specie diffuse in Giappone, Cina, Florida, Georgia e California e, appunto, il genere *Taxus* Linnaeus tipico di buona parte dell'emisfero settentrionale. La collocazione di *Amentotaxus* Pilg. è, invece, controversa a causa di importanti differenze riproduttive riguardanti la presenza di due ovuli nell'archoosporio, secondo Gellini andrebbe collocata nelle *Cephalotaxaceae*. Il genere *Taxus* è tuttavia al centro di discussioni riguardo la posizione sistematica, in quanto mancano caratteri inequivocabilmente distintivi, sia a livello morfologico che chimico. La maggior parte degli autori è comunque concorde nell'assegnare al genere 8 specie distinte sulla base di criteri di distribuzione geografica (Tab.3.1), mentre per altri autori il genere è in realtà semplicemente una grande specie suddivisa in una moltitudine di varietà o razze geografiche (Debazac, 1964).

Tabella 2.1 Specie e distribuzione del genere *Taxus*

Nome scientifico	Distribuzione
<i>Taxus baccata</i> L.	Europa, Nord Africa, Asia Minore
<i>Taxus floridiana</i> Chapm	Florida
<i>Taxus globosa</i> Schlechtd.	Messico
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	.Montagne Asia centrale (Himalaya, Sikkim e Cina)
<i>Taxus canadensis</i> Marsh	Versante orientale del Nord America
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Coste nordamericane del Pacifico
<i>Taxus celebica</i> Li	Asia meridionale, dalla Cina meridionale alle Filippine
<i>Taxus cuspidata</i> Sieb.	Giappone

Tra questi, l'unico taxon che si differenzia in modo palese per la morfologia fogliare, tipicamente falcata e mucronata all'apice, è *Taxus cuspidata* Sieb. Vanno poi aggiunti due ibridi artificiali: il *Taxus hunnewelliana* Rehd, ibrido fra *T. cuspidata* e *T. canadensis* e *Taxus media* Rehd., ibrido fra *T. baccata* e *T. cuspidata*. Complessivamente le varietà segnalate, fra naturali e coltivate, sono 70 (Thomas e Polvart, 2003), compreso il tasso irlandese colonnare (cv. Fastigiata Loudon) che ha origine sul fianco del monte Cuilcagh nella contea di Fermanagh, Irlanda del Nord, rinvenuto per la prima volta nel 1780.

Caratteristica della famiglia è la presenza di microsporofilli peltati che presentano 2-8 androsporangii e ovuli solitari portati all'apice dei rami fertili, rispetto ai coni multiovulati delle Pinaceae; il seme è coperto da un involucro carnoso derivato da un cercine posto alla base dell'ovulo stesso. Il carattere morfologico maggiormente discostantesi dal resto delle specie del genere è l'assenza di strobilo femminile. La semplicità dell'apparato riproduttore rispetto alle altre *Pinales* viene identificato non come un carattere ancestrale conservatosi, quanto piuttosto ad una semplificazione morfologica (Gellini, 1996); il cono uniovulato indicherebbe infatti un carattere di maggiore evoluzione rispetto a quello delle Pinaceae. Le foglie sono tipicamente aciculate con picciolo decorrente sul ramo. Altro macroscopico carattere di distinzione è l'assenza di resina e, conseguentemente, di canali resiniferi.

3.2 Morfologia e biologia

Arbusto o albero di media statura, alto generalmente 8-10 metri, ma che può raggiungere anche 15-20 m di altezza e oltre 3 m di diametro. Sulle montagne del Nord Africa (Montagne dell'Atlante), Asia Minore e Caucaso è presente *T. baccata* L. con forme arboree che possono raggiungere anche i 32.5 m di altezza (Paule *et al.*, 1993), (Mukunda *et al.*, 2000). La chioma, di colore verde cupo e di forma arrotondata o conica, è inserita in basso sul tronco. Sono numerosi i fenomeni di getti epicormici che talvolta tendono a ricoprire interamente il fusto, specialmente in situazioni di stress quali il morso degli erbivori o frequenti potature. I getti laterali crescono ad intervalli irregolari e fanno sì che spesso non vi sia una vera dominanza apicale; fenomeno estremamente presente in caso di disturbo da pascolamento eccessivo. Tronco di solito ramificato a breve altezza, talvolta già dalla base, più raramente eretto e indiviso; la sezione si presenta per lo più asimmetrica e spesso si rinvengono numerosi fenomeni di concrescimento di numerosi fusti, specialmente nelle piante di grosso diametro. Talvolta sul fusto si notano ingrossamenti semisferici che sembrano derivare dallo stress attribuibile al pascolo eccessivo. La corteccia, di colore rosso-bruno, è sottile e liscia sino ad una certa età; negli alberi più vecchi si sfoglia in placche di forma poligonale o in strisce più o meno allungate. Le foglie aghiformi, lineari, lunghe 1-3 cm e larghe 2-3 mm, dalla consistenza cuoiosa, sono inserite a spirale sui rami, ma come nell'abete bianco risultano distiche per torsione alla base. Nella pagina superiore gli aghi sono di colore verde scuro e lucente, mentre inferiormente assumono una tonalità più chiara. Tuttavia le linee stomatifere non presentano mai quel colore biancastro tipico dell'abete bianco. Presentano una forma leggermente falcata con un piccolo mucrone all'apice. Il sistema radicale è robusto ed espanso, tendenzialmente orizzontale con numerose radichette secondarie molto ramificate. E' perfettamente in grado di vegetare su aree estremamente rocciose poiché è in grado di penetrare le fessure della roccia lasciando le radici principali allo scoperto. Questo esteso apparato consente alla specie di svilupparsi in molteplici condizioni pedologiche rendendola così plastica ed estremamente ubiquitaria. (Thomas e Polwart, 2003).

Ecologia. Il tasso cresce in condizioni ottimali a temperature moderate del clima mite oceanico. Favorevoli al suo sviluppo sono inverni miti, estati fresche, precipitazioni abbondanti e umidità elevata. Al contrario ne limitano la crescita tasso il rigido freddo invernale, gelate tardive, e l'esposizione venti molto forti. Per quanto riguarda le esigenze termiche, si osserva che il tasso ha un range molto ampio, stimabile sull'ordine dei 70°C. Si notano comunque forti limitazioni, soprattutto a carico delle gemme, per lunghe ed

ininterrotte esposizioni al freddo accompagnate da forti venti gelidi, mentre la soglia superiore di sopravvivenza si può constatare con la morte del 50% della chioma a 51°C.

Le esigenze idriche sono di almeno 1000 mm di pioggia annua, anche se risulta essere resistente a stress da siccità, grazie anche ad uno xeromorfismo fogliare che permette al *T. baccata* di reagire a condizioni di siccità emettendo nuovi aghi, caratterizzati da ispessimento della cuticola, diminuzione del numero di stomi per unità di superficie e riduzione dell'area fogliare stessa.

Il tasso è considerata da sempre come una specie sciafila, o meglio fortemente tollerante l'ombra; a conferma di ciò, si trova spesso nelle cenosi che il faggio forma con l'agrifoglio, entrambe specie ombro tolleranti. Considerando la sua distribuzione europea, però, si nota come la necessità dell'ombra sia piuttosto legata a esigenze idriche e termiche dovute ad un suo carattere marcatamente atlantico, piuttosto che al solo fototropismo. Da un punto di vista edafico, la specie risulta abbastanza ubiquitaria (Brzeziecki e Kienast 1994; Thomas e Polwart, 2003).

3.2.1 Caratteristiche riproduttive

Il tasso raggiunge la maturità sessuale a circa 30-35 anni di età in condizioni di albero singolo ed in pieno sole. In aree con elevata copertura con scarsa illuminazione risulta che la fruttificazione può essere posticipata di molto, addirittura non prima dei 70-120 anni (Thomas e Polwart, 2003).

E' specie dioica, cioè presenta generalmente individui con sessi separati (Fig 3.1), anche se sono stati osservati casi in cui che la stessa pianta può cambiare sesso più volte nel corso della vita e che talvolta si sviluppano solo porzioni della stessa con sesso differente (Thomas e Polwart, 2003).



Figura 3.1. A sinistra dettaglio di un individuo femmina di *T.baccata* (particolare di un arillo); a destra dettaglio di un individuo maschio che porta fiori maschili.

Tale variazioni potrebbero essere correlabili anche ad un'influenza della componente ambientale oppure del vigore stesso delle piante. I fiori maschili sono portati in amenti ascellari, mentre quelli femminili, solitari, verdi e poco appariscenti, sono portati da brevi rametti; la fioritura avviene tra gennaio ed aprile.

Il tasso ha impollinazione prevalentemente anemofila, anche se non mancano casi di entomofilia, soprattutto ad opera delle api.

A maturazione avvenuta, la nucella, secerne un fluido zuccherino che si concentra in una goccia all'orifizio del micropilo. Funzione della goccia è quella di intrappolare il polline portato dal vento, per poi essere riassorbita. Una volta assorbita, la goccia, migra nella zona di separazione delle nucelle dove avviene la fecondazione. I gameti maschili mancano di motilità.

L'ovulo, una volta fecondato in primavera (aprile-maggio), si sviluppa in un arillo di colore verde, aperto alla sommità, che a fine estate-inizio autunno diviene viscoso e di colore rosso.

La varietà lutea è così chiamata per l'arillo giallo a maturità. Nell'arillo è contenuto un seme elissoideale di 6-7 mm caratterizzato da un tegumento durissimo.

L'età in cui inizia la produzione di seme è molto variabile: normalmente inizia intorno ai 30-35 anni per piante isolate, mentre è molto più elevata nel caso di piante poste sotto una densa copertura arborea e arriva a 70-120 anni (White, 1998).

La produzione può essere annuale o ogni 2-3 anni. Ogni seme pesa dai 44,9 ai 69,5 mg e mantiene la sua vitalità anche per 4 anni.

La disseminazione è zoocora ed il contributo maggiore è dato dai turdidi (merli e tordi) (Hulme, 1996) che, attirati dal colore rosso, si cibano della parte carnosa del frutto espellendo poi il seme favorendo in questo modo la rottura della dormienza; il procedimento di digestione solitamente sembra svolgersi in circa 45 minuti (Giertych, 2000). Nella dispersione dei semi del tasso, un ruolo di primo piano sarebbe svolto anche dai micromammiferi (p.e. *Apodemus sylvaticus*) consumatori dei suoi semi. Questi animali, non consumando tutte le scorte accumulate per l'inverno al piede dei grandi faggi o comunque di altre cavità, facilitano così la diffusione della specie.

3.2.2 Germinabilità

La variabilità dei semi è alquanto elevata e sfiora il 100%, questo da origine a numerose complicazioni per quanto riguarda le pratiche vivaistiche di riproduzione del tasso. La germinabilità normalmente si attesta attorno al 50-70% e raggiunge il 95% dopo il terzo anno. I semi raramente germinano il primo anno e di solito si ha il massimo nel secondo e terzo anno.

La dormienza così forte è imputabile ad un'immaturità dell'embrione al momento della maturità del seme, infatti anche trattando con acido solforico, oppure con acqua, oppure alternando periodi di caldo ad altri di freddo, non si ottengono risultati accettabili come avviene per le altre specie. La germinazione in natura è senza dubbio facilitata dal passaggio nel tubo digerente degli uccelli, i cui succhi gastrici sembrano essere i soli in grado di accelerare i fenomeni di germinazione (Thomas e Polwart, 2003). Solitamente i semi germinano la primavera seguente la loro espulsione da parte degli animali che se ne nutrono (Garcia *et al.*, 2000).

La germinazione è epigea ed i semi si presentano con due cotiledoni dall'apice arrotondato. Alla fine della prima stagione i semenzali sono normalmente alti circa 2- 8 centimetri; la

crescita è molto lenta nei seguenti 4-5 anni ed in media si attesta attorno ai 2.5 cm annui (Fig. 3.2)

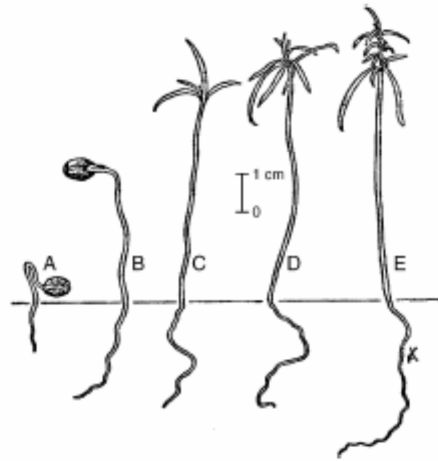


Figura 3.2. Germinazione e semenzali di *Taxus baccata* a)- 1 giorno; b)- 8 giorni; c)- 12 giorni; d)- 22 giorni; e)- 39 giorni, da Thomas e Polwart, 2003.

Il seme ha una germinabilità massima del 100% circa, ma i valori solitamente tendono a oscillare tra il 50% e il 70%; tali valori non sembrerebbero essere influenzati dal passaggio attraverso l'apparato digerente degli uccelli, quanto dalla presenza o meno dell'arillo, infatti il valore di germinabilità in assenza di arillo decade del 4-6%.

La germinazione del seme difficilmente avviene nel primo anno a causa della dormienza del seme stesso che, dovuta probabilmente all'immaturità dell'embrione al momento della maturazione del frutto, si interrompe naturalmente dopo 2 o 3 anni.

È possibile interrompere la dormienza artificialmente tramite *pre-chilling*; le prescrizioni di massima dell'impiego di questa tecnica prevedono un periodo di 60-120 giorni in cella frigorifera a -2,-5°C. La germinazione è epigea. La plantula presenta tre o quattro foglie opposte e raggiunge l'altezza di 2-8 cm durante la prima settimana, in 4-5 anni si raggiungono incrementi in altezza di 2,5 cm. La radice durante il primo anno si sviluppa come un grosso cordone centrale con poche branche laterali. L'ipocotile è di colore verde scuro (Perrone, 2000), le foglie primarie sono dapprima opposte, poi, con la distensione apicale, alterne.

3.3 Tossicità e proprietà chemioterapiche

Tutte le parti del tasso ad eccezione dell'arillo contengono un complesso di alcaloidi velenosi per l'uomo e per la maggior parte degli animali domestici: la tassina. Anche i semi sono tossici.

La tassina è un complesso di alcaloidi che è rapidamente assorbito dal tratto digestivo e va ad interferire con la normale attività cardiaca. Studi sugli umani hanno dimostrato che questi alcaloidi sono altamente diuretici e causano così forti aritmie ventricolari. La dose letale per i ruminanti è stata stimata intorno ad 1-10 g/kg di peso corporeo mentre per gli equini, molto più sensibili a questo alcaloide, i valori letali scendono a 0,5-2 g/kg. La dose letale per i conigli risulta, invece, di 20g/kg. Sembra inoltre che il tenore di tassina vari con la stagione (2% in gennaio; 0.6% in maggio) e che le foglie vecchie siano più velenose rispetto a quelle giovani. Sembra comunque oramai assodato che con il tempo si verifichi una sorta di assuefazione da parte degli erbivori nei confronti della tassina; assunzioni costanti e crescenti di foglie non causano nessun problema agli animali.

Negli umani i primi sintomi di avvelenamento sono nausea, vomito, dolori addominali, sensazione di freddo diffuso, tremore muscolare, pulsazioni prima accelerate e quindi deboli ai cui segue la morte per collasso. Il decesso avviene quindi per problemi cardio-respiratori.

Nel 1971 fu scoperto un altro alcaloide il paclitaxel, (nome commerciale taxolo[®]), un prodotto naturale estratto inizialmente dalla corteccia di *Taxus brevifolia*, dove è presente in alta concentrazione, con significative proprietà anticancerogene (Wani *et al.*, 1971; Douros e Suffnes 1978; Rowins *et al.*, 1990; Rose, 1992; Arbuck 1992). Il taxolo è stato successivamente rinvenuto sia nel fusto, negli aghi e nelle radici del tasso del Pacifico che di altre specie e varietà di tasso incluso *Taxus baccata* (Witherup *et al.*, 1990).

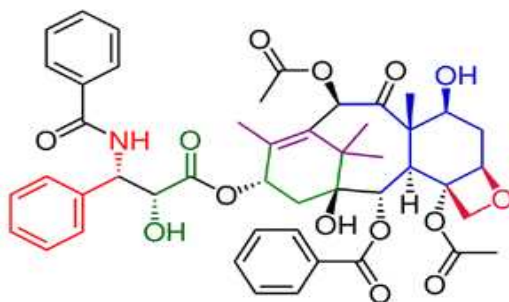


Figura 3.3. Struttura molecolare del taxolo.

Il taxolo si lega ai microtubuli - target privilegiato per numerosi agenti antitumorali -li stabilizza, inibendone la depolimerizzazione e inducendo un effetto antimitotico che è particolarmente devastante nelle cellule in rapida divisione, come le cellule tumorali. Esso è

risultato molto attivo in diversi carcinomi e sarcomi umani ed il suo meccanismo d'azione è unico e differente da altri agenti anticancro presenti sul mercato. La maggior parte degli antimitotici, quali gli alcaloidi della vinca e la colchicina, depolimerizzano il fuso mitotico. In questo modo la cellula non è più in grado di dividersi. Con il taxolo, invece, la cellula non riesce a duplicarsi finché il farmaco è presente nell'organismo. Esso induce una sorta di cristallizzazione del fuso mitotico, impedendo la conclusione del processo di divisione cellulare. In presenza di paclitaxel i cromosomi non sono in grado di muoversi in direzione opposta di quella delle cellule che si stanno dividendo, a causa del fatto che i microtubuli non si decompongono. La divisione cellulare viene interrotta, e viene indotta l'apoptosi cellulare ovvero una rapida morte (per suicidio cellulare) delle cellule cancerogene. (Foss *et al.*, 2008).

La sostanza è efficace in molti tumori refrattari, compresi quelli della testa, del collo, quelli a piccole cellule del polmone e può rallentare la progressione del melanoma ed agisce prevalentemente su tumori solidi (Whelan, 2002).

3.4 Propagazione agamica

A causa della complessità della molecola del tassolo, non è stato possibile realizzarne la sintesi in laboratorio sino al 1993, quando Nicolau *et al.*, hanno ottenuto un prodotto di sintesi, che però non è risultato un'alternativa economicamente vantaggiosa rispetto al prodotto naturale. Questo ha comportato il protrarsi dell'abbattimento di un numero elevato di *Taxus brevifolia* (Stull, 1992), anche perché fino al 1995 la corteccia del tasso del Pacifico era l'unica fonte di taxolo ammessa per usi clinici. Il ritrovamento di questo importante composto anche in altre specie di tasso ha, probabilmente alleggerito la pressione su questa specie ma, al contempo ne ha esteso lo sfruttamento ad altre da parte delle multinazionali farmaceutiche che stanno pesantemente contribuendo alla distruzione delle popolazioni naturali di diverse specie di tasso già notevolmente ridotte sia per i consistenti prelievi di legname che per l'azione di agenti biotici. Questo stato di crisi è ulteriormente aggravato dalla scarsa rinnovazione naturale che le cenosi di tasso presentano e che è dovuta a diversi fattori legati sia ai semi, per la loro bassa germinabilità, il lungo periodo di dormienza e la loro predazione da parte dei roditori (Smal e Fairley, 1980), che i semenzali caratterizzati da una crescita estremamente lenta, oltretutto, appetiti dagli erbivori, nonostante la tossicità del loro fogliame (Allison, 1990).

Considerato che il tasso raggiunge la maturità sessuale attorno i 70 anni e che la sopravvivenza delle tassete è dovuta unicamente all'estrema longevità delle piante (Watt, 1926; Tittensor, 1980), si rende necessario il ricorso a metodi alternativi di propagazione

come quella vegetativa, che da una parte consentirebbe una produzione massale di piantine di tasso dai cui aghi e radici si potrebbe estrarre il taxolo in quantità sufficienti per gli usi clinici e d'altra parte permetterebbe la conservazione di un patrimonio genetico seriamente minacciato (Bellarosa, 2003).

Talee. È noto che le talee della gran parte delle varietà ornamentali di tasso, per altro caratterizzate da un alto grado di giovanilità che le rende più suscettibili agli stimoli rigenerativi, mostrano una buona attitudine alla radicazione quando sono trattate con le auxine (Eccher, 1988), mentre scarsi sono i riferimenti bibliografici riferiti alla propagazione vegetativa di materiale prelevato da alberi, spesso vetusti, appartenenti alle formazioni naturali.

La gran parte dei pochi lavori riportati in letteratura fanno riferimento ad esperienze di propagazione di *T. baccata* condotte sotto tunnel di plastica o serre ed utilizzando soprattutto getti dell'anno. Hartman e Kester (1965) consigliano di usare letti caldi a 21°C con temperature dell'aria di 10-13 °C per il radicamento in serra di talee raccolte nei mesi di novembre e dicembre. Una temperatura del substrato di 10-12 °C è quella ottimale secondo Namvar e Sperthman (1986) per ottenere la radicazione in serra di talee raccolte da agosto a febbraio ed immerse in una soluzione di acido naftalen acetico (50mg/l). Gordienko e Sapzhnikova (1974) individuano nel periodo di prelievo del materiale, ovvero all'inizio della ripresa vegetativa, il fattore di successo della tecnica colturale, coadiuvato dall'impiego di una soluzione di auxina allo 0,01% o di una di sodio allo 0,005%. Nandi *et al.* (1996) riportano una maggiore percentuale di radicamento quando le talee, ottenute dai getti dell'anno, sono trattate con acido indoli butirrico concentrazione 0,25 mM (85-95% di radicazione rispettivamente per talee femminili e maschili o con il fungicida Bavistin allo 0,05% e protette da un tunnel di plastica. Schneck (1996) sottolinea l'alta influenza che la pianta madre, indipendentemente dal sesso della stessa, esercita sul radicamento delle talee. Sempre l'acido indoli butirrico, somministrato in polvere alla base delle talee, è risultato l'ormone più efficace nelle prove di radicamento condotte da Dubey (1997) su talee lunghe 25-30 cm e poste a radicare sotto serra (80% di radicamento). Una combinazione di acido indoli butirrico à- Naphtol (à-N) in soluzione alla concentrazione di 100 ppm ciascuno, con immersione delle talee per 24 h, è quella che garantisce la percentuale più alta di radicamento, nell'ordine del 67,5%, nelle esperienze condotte in vivaio forestale da Mitter e Sharma (1999) su talee provenienti da rami di 1, 2 e 3 anni protette con teli di plastica.

Micropropagazione in vitro. Da stime effettuate emerge che è necessario abbattere circa 6000-7000 individui di *Taxus brevifolia* Nutt. di 28 centimetri di diametro medio, per ottenere circa 27700 Kg. di corteccia essiccata; da questa per estrazione in laboratorio si producono circa 4 Kg. di tassolo allo stato cristallino (Bolsinger e Jarmillo, 2001). Sulla base di questo e di calcoli analoghi, è molto probabile che la fornitura di impianti di materiale di tasso potrebbe essere un fattore limitante in futuro (Croom, 1995).

Pertanto, è necessaria un'attenzione particolare al fine di mantenere una fornitura costante e adeguata di questa pianta (Abbasin *et al.*, 2010). Difatti, parallelamente ai metodi per la propagazione vegetativa sviluppati ed ottimizzati in diversi paesi (Schneck, 1996. Ewald *et al.*, 2002), sono stati approfonditi metodi di micropropagazione *in vitro* di varie specie di tasso aventi il fine di moltiplicare il materiale selezionato per la produzione di taxoidi. Tuttavia, il numero di pubblicazioni relative a tali risultati è piuttosto limitata (*Taxus mairei* - Chee, 1995; Chang *et al.*, 1998, 2001; *T. baccata* - Majada *et al.*, 2000; Metaxas *et al.*, 2004). Inoltre la rigenerazione delle piante è risultata spesso difficoltosa e la percentuale di espianti germinati si è rivelata non soddisfacente, tanto che non è disponibile ad oggi in letteratura un protocollo rapido, completo e di successo che valga come riferimento per la micropropagazione di questo genere.

Di recente, sono state condotte diverse ricerche volte alla produzione di taxol da altre piante come ad esempio da *Corylus avellana* (Bestoso *et al.*, 2006; Ottaggio *et al.*, 2008) mostrando tuttavia una carenza della produzione dell'alcaloide.

Alcuni lavori riferiscono prove di embriogenesi somatica di *Taxus*, per lo più provenienti da espianti molto giovanili come gli embrioni immaturi zigotici, (Wann e Goldner, 1994) anche i questi casi la rigenerazione delle piante è risultata (*Taxus brevifolia* - Ewald *et al.*, 1995 e *Taxus chinensis* -. Qiu *et al.*, 1998).

3.5 Citogenetica

La totalità delle specie del genere *Taxus*, come la maggior parte delle Gimnosperme, possiede un numero cromosomico di $2n = 24$. Tuttavia i dati relativi a tali indagini citogenetiche provengono principalmente da pubblicazioni molto datate (Dark, 1932; Sax e Sax 1933), le quali rappresentano ancor oggi il riferimento primario sul cariotipo del tasso.

Il lavoro di Dark (1932): “*Chromosomes of Taxus, Sequoia, Cryptomeria and Thuia*” è un’indagine citologica di più generi, e per il tasso riporta come materiale di partenza per le analisi citogenetiche *i root tips*, ovvero apici radicali, ottenuti da talee messe a dimora per diversi mesi (nell’articolo non sono specificati tuttavia né i dettagli delle tecniche di propagazione, né metodi di trattamento e sincronizzazione degli apici. Si rimanda solo a La Cour (1931), per fissaggio nel liquido Flemming e Benda e la colorazione del materiale con l’antimitotico violetto di genziana).

I cromosomi somatici sono stati osservati in cellule in metafase mitotica tuttavia, come riporta lo stesso autore nella pubblicazione, le immagini sono risultate di difficile interpretazione. Difatti i cromosomi si presentavano su un ristretto piano equatoriale sottili, lunghi e confusi poiché ammassati e sovrapposti (in figura 3.4 è riportato il disegno dello *spread* metafasico dei cromosomi di *T. baccata* presente nell’articolo di Dark, frutto di una rielaborazione a mano dei cromosomi visualizzati al microscopio ottico).

L’autore riporta inoltre, che non è stata trovata una rilevante differenza nella morfologia dei cromosomi provenienti da individui di sessi opposti. Nello specifico gli individui non sembrano mostrare cromosomi eteromorfici o etero gametici. In entrambi i sessi, sottolinea invece Dark, sono presenti due cromosomi aventi una costrizione sub-terminale e ventidue cromosomi caratterizzati da una costrizione sub-mediana. Egli tuttavia precisa che non sono stati possibili studi più approfonditi sulla morfologia dei cromosomi poiché le rielaborazioni a mano non sarebbero sufficienti a ricostruire il cariotipo della specie a causa della disposizione non chiara dei cromosomi (eccessivamente sovrapposti tra loro) per tutta la lunghezza del piano equatoriale.



Figura 3.4 Rielaborazione a mano degli *spreads* metafasici di due individui di *Taxus baccata* $2n= 24$ (maschio, a sinistra; femmina a destra), Dark (1932).

Relativamente al contenuto in DNA del genoma di *T. baccata* ci si riferisce a due lavori (Greilhuber, 1988 in Murray, 1998; Zonneveld, 2012) i quali compendiano entrambi il contenuto di DNA nucleare nelle conifere; essi valutano la quantità presente nelle cellule rispettivamente utilizzando il metodo della “*Feulgen microdensitometry*” e della citometria a flusso in cui il DNA viene marcato con lo ioduro di propidio. *T. baccata* risulta avere una media di 1C value medio di 11070.96 (Mp) pari a 11.05 (pg).

3.6 Caso studio: fenomenologia sessuale di *Taxus baccata* nel popolamento di Carpineto Romano (RM).

Dal duemila il gruppo di ricerca del dipartimento DAFNE, guidato dal professor Schirone ha portato avanti un campionamento lungo la regione appenninica, preappenninica centrale e la Sardegna, che ha avuto lo scopo di saggiare le diverse condizioni di vegetazione della specie, rilevate mediante la metodologia dendrometrica e del rilievo della rinnovazione e in aree di saggio casuali nei tratti di bosco con presenza di tasso. Nessun criterio predefinito ha condizionato la scelta iniziale dei biotopi da visitare; l'unica attenzione è stata rivolta all'esigenza di considerare una pluralità di siti di vegetazione spaziatati soprattutto in senso geografico, in modo da poter riferire sugli aspetti generali o differenziali delle condizioni di vegetazione della specie nell'area geografica dell'intera area centrale.

I parametri rilevati nell'area di saggio hanno riguardato sia le caratteristiche fisiche e morfologiche del terreno sia dendrometriche; per la maggior parte dei siti è stata condotta un'accurata indagine sulla *sex-ratio* dei popolamenti di tasso (tesi di dottorato, Salis, 2012).

Una particolare attenzione è stata dedicata al popolamento di tasso di Carpineto Romano situato in un canale del Monte Semprevisa facente parte della catena dei Monti Lepini. L'intero massiccio è calcareo. Il canale che ospita il popolamento ha un orientamento N-NE, ad una quota di circa 850 m s.l.m. Con un orientamento in direzione N-E. Il popolamento di tasso segue un compluvio e risulta in parte in forra. La vegetazione presente è costituita da faggio, agrifoglio e tasso.

Nella stazione di Carpineto Romano è stato possibile osservare nella tarda primavera del duemila un fenomeno, probabilmente non tanto raro quanto si potrebbe essere autorizzati a credere stante la scarsa letteratura a riguardo, quello della presenza di fiori di entrambi i sessi sullo stesso individuo (tesi di dottorato, Di Cosmo, 2002). Le piante in questione avevano prodotto fiori maschili in abbondanza e al tempo in cui sono state osservate (giugno 2000) la pollinazione era già avvenuta. Sulle stesse piante i fiori femminili erano ascellari sul rametto o anche sulla parete superiore e vicino ai maschili. Un fenomeno simile è stato descritto a Pescopennataro e Sos Niberos (tesi di dottorato, Salis, tesi di dottorato, 2012).

La segnalazione assume particolare rilevanza per la frequenza di individui che si presentavano "monoici" e per la quantità considerevole dei fiori di entrambi i sessi, cosicché inizialmente non è stato possibile risalire al sesso "tipico" di ogni individuo.

Tale fenomenologia ha scaturito un notevole interesse per il comportamento sessuale della specie che si è manifestato con un incremento dei monitoraggi della tasseta in questione.

A partire dalla stagione seguente 2001 sono stati condotti infatti rilievi puntuali prendendo come campione del popolamento di tasso un microgruppo di ventiquattro individui di entrambi i sessi, opportunamente cartellate in campo.

Tali piante sono state oggetto di un monitoraggio pluriennale terminato nel 2011 in cui si prendeva visione, con una cadenza media bimensile, dello stadio fenologico delle gemme, del sesso della pianta e della misura la lunghezza dei getti annuali.

Sono stati segnati anche parametri relativi alla temperatura, umidità relativa, condizioni edafiche (Vessella e Schirone 2011).

L'esito del monitoraggio ha individuato che una considerevole percentuale degli individui oggetto del monitoraggio della tasseta di Carpineto, circa il 60%, cambiano sesso quasi ogni anno (Vessella e Schirone 2011).

Il fenomeni della cosessualità e dell'inversione del sesso per questa specie, hanno suscitato una serie di interrogativi sull'ecologia e sul comportamento sessuale di questa specie, stimolandone studi approfonditi sulle differenze morfologiche ed ecologiche tra i due sessi, al fine di comprendere se esistano o meno caratteristiche ambientali che inducono il *sex-shifting*, e se esso influenzi indifferentemente piante maschili o femminili (Vessella e Schirone, 2011; tesi di dottorato, Salis, 2012).

A seguito di tali considerazioni ecologiche, nel presente progetto si è voluto indagare sull'eventuale predeterminazione genetica del sesso in *Taxus baccata* mediante la ricerca di cromosomi sessuali.

Come riportato in precedenza è necessario sottolineare che i dati relativi alle indagini citogenetiche su questa specie forestale provengono principalmente da pubblicazioni molto datate. Pertanto lo scopo principale perseguito in questa tesi di dottorato è stato quello di realizzare un *update* del cariotipo *Taxus baccata*, impiegando tecniche di citogenetica molecolare attualmente convalidate ed utilizzate dalla comunità scientifica.

Parte Sperimentale

4. Materiali e Metodi

4.1 Materiale vegetale

Gli studi cariologici di conifere presenti in letteratura, riportano il seme come migliore materiale di partenza, in alcuni casi trattato per stimolarne la germinazione e prelevarne l'apice radicale della radichetta neoformata. Tale tessuto meristematico è considerato il più idoneo in quanto ricco di cellule in divisione tra cui le cellule in metafase, nelle quali i cromosomi sono facilmente visibili perché maggiormente contratti.

Considerando la difficoltà relativa ai tempi di germinazione del seme di tasso, nel presente progetto di ricerca, si sono sperimentati tre approcci paralleli. Essi si sono avvalsi di tre differenti tecniche di propagazione vegetativa, al fine di ottenere materiale biologico idoneo e sufficiente per le successive analisi citogenetiche:

1. Coltivazione *ex novo* di talee legnose di *T. baccata* messe a dimora in serra nel mese di dicembre 2010- periodo tardo autunnale seguendo le indicazioni di Bellarosa, 2003.
2. Campionamento di apici caulinari di individui adulti di *T. baccata* viventi in ambienti naturali e spontanei seguito da un taleaggio e trattamento degli stessi in condizioni controllate, al fine di stimolare l'attiva divisione degli apici meristematici.
3. Micropropagazione *in vitro* degli embrioni di tasso su differenti terreni di coltura. Sono stati acquistati semi di *T. baccata*, i quali sono stati pretrattati con etanolo e ipoclorito di sodio in condizioni sterili, al fine di interrompere la loro dormienza. Gli espianti sono stati seminati su diversi terreni di coltura -MS, Murashige e Skoog (1962) e WPM, Woody Plant Medium (Lloyd e McCown, 1981), in condizioni di luce e buio.

4.1.1 Talee legnose di *T. baccata*

Nel mese di Novembre 2010 ha avuto inizio la messa a dimora di talee legnose di *T. baccata*, presso il Vivaio Forestale Sperimentale all'interno dell'Azienda agraria didattico-sperimentale "Nello Lupori", centro di servizi e ricerca dell'Università degli Studi della Tuscia. Le marze per il taleaggio sono state raccolte da due diversi popolamenti (da piante di sesso differente, secondo quanto descritto in Tab. 4.1):

- individui di sesso femminile tassò presenti all'interno del Villa Comunale di Ronciglione (VT).
- individui di sesso maschile e femminile presso la stazione di Carpineto Romano (RM). I sessi degli individui del popolamento di Carpineto Romano, riportati in tabella, fanno riferimento all'ultimo monitoraggio effettuato nel 2010 (§ 3.6).

Tabella 4.1. Campionamento e caratteristiche delle talee legnose di *T. baccata* messe a dimora nel Novembre 2010. Il numero della pianta per il popolamento di Carpineto Romano fa riferimento al numero del cartellino assegnatogli per il monitoraggio.

Popolamento	N° PIANTA	SEX	N° TALEE per pianta
Carpineto Romano	1	F	20
Carpineto Romano	3	M	20
Carpineto Romano	4	M	20
Carpineto Romano	13	M/F *	20
Carpineto Romano	17	F	20
Carpineto Romano	18	F	20
Carpineto Romano	19	M/F *	20
Carpineto Romano	21	F	20
Carpineto Romano	22	M	20
Carpineto Romano	23	M	20
Carpineto Romano	24	M	20
Carpineto Romano	Miste	Miste	20
Ronciglione	1	F	20
Ronciglione	2	F	20
Ronciglione	3	F	20
Ronciglione	Miste	F	20

*la sigla M/F indica che la pianta in questione ha presentato nell'ultimo anno di monitoraggio un'espressione sessuale "ballerina" ovvero alternata tra maschile e femminile (§.3.6. relativo al monitoraggio del popolamento di Carpineto).

NUMERO TOTALE DI TALEE LEGNOSE CARPINETO = 240

NUMERO TOTALE DI TALEE LEGNOSE RONCIGLIONE = 80

NUMERO TOTALE DI TALEE LEGNOSE = 320

Il taleaggio è stato effettuato entro poche ore dal prelievo della marza della pianta madre, in coltura protetta, garantendo condizioni di temperatura (temperatura ambiente 16°C, temperatura del letto di radicazione 18°C) e umidità costanti (sistema di irrigazione automatizzato con nebulizzazione dall'alto). Le talee della lunghezza 25-30 cm sono state prelevate dai germogli dell'anno (Fig 4.1), con una porzione basale di legno di un anno che è stata privata dalle foglioline laterali (gli aghi che si trovano nella parte superiore della talea vengono ridotti per limitare la traspirazione, il fabbisogno energetico della parte aerea quindi per indurre stress e stimolare la pianta a radicare).

Sono state utilizzate delle sostanze fitoregolatrici come l'auxinosimile sintetico, l'Acido indol-3-butyrico (IBA), e l'acido naftilacetico (NAA) che facilitano l'accumulo di auxine naturali nella regione basale della talea, stimolando la produzione delle prime radici. Gli ormoni sopradetti sono stati utilizzati secondo i due seguenti procedimenti:

- 1) Acido 1-naftilacetico (NAA) puro all'1% , nome commerciale Naftal (Aifar Agrochimica). Il trattamento con NAA è stato somministrato alla maggior parte (circa il 90%) delle talee messe a dimora. Esse sono state inizialmente pretrattate in acqua per 24h. Il fitoregolatore NAA è stato utilizzato in forma di polvere (talco) applicandolo sulla parte basale delle talee legnose per facilitarne l'emissione delle radici avventizie.
- 2) Acido indol-3-butyrico IBA 3g/l (marca). Una percentuale minima di talee legnose, circa il 10%, sono state immerse per 24h in una soluzione Acido indol-3-butyrico IBA 3g/l (Duchefa Biochemie). L'IBA fa parte dei regolatori della crescita che agisce sulla distensione e divisione cellulare, la rizogenesi, il geotropismo.

Composizione del terreno utilizzato come substrato delle talee legnose:

- 50% di terriccio filtrato;
- 30% di terriccio concimato;
- 20% sabbia per il rilascio lento di acqua e per evitare la compattazione del suolo.

Al terreno è stato aggiunto uno strato superficiale di sabbia (al fine di prevenire la formazione di crosta superficiale nelle stagioni calde).

Le talee sono state impiantate in vasi a 10 cm di distanza le une dalle altre, garantendo in tal modo lo spazio necessario ad ognuna per lo sviluppo dell'apparato radicale. Esse

sono state opportunamente sistemate al coperto in serra, ed innaffiate un paio di volte a settimana per circa sette mesi, protette da una rete ombreggiante.

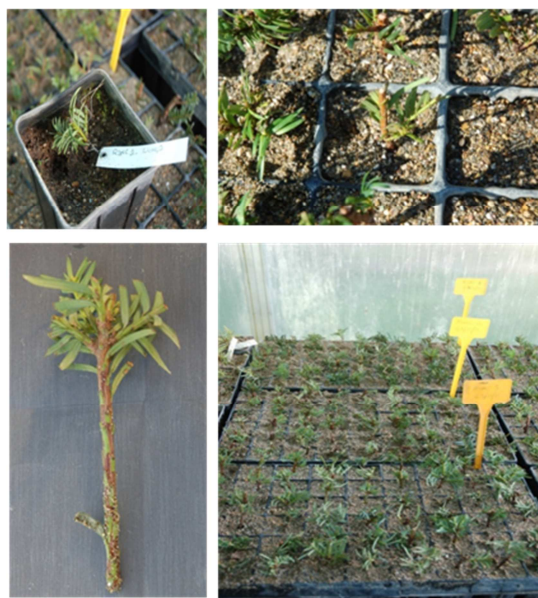


Figura 4.1. Talee legnose di *T. baccata*. Foto in dettaglio della messa a dimora avvenuta presso il Vivaio Forestale Sperimentale dell'Università della Toscana.

4.1.2 Talee erbacee di *T. baccata*: trattamento degli apici caulinari

Parallelamente alla tecnica del taleaggio si è scelto di testare gli apici caulinari di *T. baccata* come ulteriore tessuto meristematico in attiva divisione, per esaminarne l'indice mitotico e la qualità delle metafasi. Nei mesi di febbraio e marzo 2011 - periodo fenologicamente idoneo in cui si verifica l'ingrossamento delle gemme vegetative in *T. baccata* - è stato effettuato un campionamento di dei getti annuali di tasso provenienti dagli stessi popolamenti cui si è fatto riferimento per le talee legnose. Utilizzando questo materiale biologico, sono state messe a dimora delle talee erbacee di tasso in un substrato misto di perlite e terreno, in condizioni controllate (ovvero con un foto periodo di 16h luce- e 8h di buio, e temperatura 24°C). L'accrescimento delle talee erbacee è stato monitorato per un periodo di venti giorni.

Ogni talea presentava una lunghezza media di 20-25 cm, e portava almeno due gemme vegetative apicali della lunghezza di circa 0.5-0.7 cm per rametto (Fig 4.2). In seguito all'osservazione delle diverse fasi di accrescimento delle gemme vegetative, sono stati individuati e testati tre diversi stadi di crescita ed ingrossamento delle loro perule, con il fine di prelevare i tessuti meristematici più idonei per le analisi citogenetiche. Tali tessuti sono stati quindi trattati secondo il protocollo di Anamthawat-Jonsson, 2003 per la visualizzazione dei protoplasti.

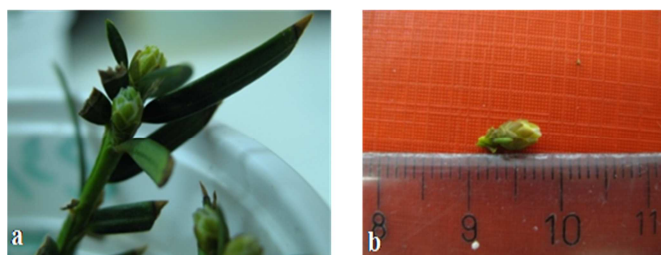


Figura 4.2. a) Dettaglio dell'apice caulinare di una talea erbacea di *T. baccata*. b) Gemma di *T. baccata*.

4.1.3 Micropropagazione *in vitro* di *T. baccata*

La tecnica della micropropagazione *in vitro* di embrioni di *T. baccata* è stata sperimentata come terzo sistema di moltiplicazione alternativo alle tecniche tradizionali di propagazione vegetativa. L'obiettivo è stato quello di ottenere in tempi relativamente brevi, la germinazione di embrioni di *T. baccata*, in differenti mezzi di coltura, al fine di utilizzare la plantula come materiale biologico supplementare da testare per le sperimentazioni successive.

Il materiale di partenza per la micropropagazione *in vitro* è stato rappresentato da semi di tasso comune, acquistati presso il vivaio Florisylva, dai quali sono stati isolati gli embrioni e fatti germinare su differenti substrati. L'asportazione dell'embrione elimina l'azione dei fattori che inducono dormienza, i quali hanno sede nei tegumenti seminali.

Un' accurata definizione del protocollo di micropropagazione, messo a punto attraverso ricerche in letteratura (Nasr *et al.*, 2007; Abbasian *et al.*, 2010; Zarek, 2007), ha previsto la definizione di complessi equilibri di fattori fisici e chimici la cui regolazione costituisce un punto critico per l'ottenimento di elevate rese quantitative del materiale propagato.

Nel processo di micropropagazione quindi si sono distinte le seguenti fasi:

Fase 1. Scarificazione dei semi. Tale fase ha previsto la rottura meccanica del tegumento duro ed impermeabile dei semi di *T. baccata* (Fig.4.3) al fine di rompere la dormienza meccanica del seme, consentendone imbibizione ed i successivi trattamenti di sterilizzazione. La scarificazione meccanica è stata eseguita mediante un'accurata rottura del tegumento esterno del seme con un martello, facendo attenzione a preservare l'integrità dell' endosperma che racchiude l'embrione.



Figura.4.3. Seme di *T. baccata*.

Fase 2. Sterilizzazione dei semi e preparazione dei substrati. La sterilizzazione dei semi, privi di tegumento, è stata preceduta da un pretrattamento dei semi nudi tenuti in immersione per 48h in acqua sterile a 4°C.

Protocollo di sterilizzazione dei semi:

- Lavaggio in una soluzione di ipoclorito di sodio 3:1.
- Immersione dei semi in acqua sterile per 5 giorni.
- Lavaggio in etanolo (EtOH) al 70% in agitazione per 3'.
- Risciacquo in acqua distillata sterile.
- Lavaggio in NaClO al 50% in agitazione per 15'.
- Tre risciacqui con acqua distillata sterile di 5' ciascuno.

I semi sterili sono stati seminati in capsule Petri contenenti 4 differenti substrati (tutti i prodotti utilizzati per l'embriocultura sono stati acquistati dalla Duchefa Biochemie):

1) **MS:** substrato costituito dagli elementi minerali di Murashige e Skoog (1962) 4,4g/l, al quale sono stati aggiunti 30 g/l di saccarosio, 5 g/l Agar come agente gelificante e 5 g/l di carbone attivo.

2) **MS + ADD:** substrato costituito dagli elementi minerali di Murashige e Skoog 4,4 g/l (1962), al quale sono stati aggiunti 30 g/l di saccarosio, 0,1 g/l di acido ascorbico, 0,1 g/l di idrolisato di caseina, 1 g/l di estratto di lievito, 5 g/l Agar come agente gelificante e 5 g/l di carbone attivo.

3) **WPM:** substrato costituito dagli elementi minerali di Woody Plant Medium 2,46 g/l (Lloyd e Mc Cown, 1981) al quale sono stati aggiunti 30 g/l di saccarosio, 5 g/l Agar e 5 g/l di carbone attivo.

4) **WPM + ADD:** substrato costituito dagli elementi minerali di Woody Plant Medium al quale sono stati aggiunti 30 g/l di saccarosio, 0,1 g/l di acido ascorbico , 0,1 g/l di idrolisato di caseina, 1 g/l di estratto di lievito, 5 g/l Agar come agente gelificante e 5 g/l di carbone attivo.

Per le quattro tipologie di terreni il pH dei mezzi è stato portato a 5,8.

Le capsule Petri (ø 6 cm). sono state preparate sotto cappa a flusso laminare, e riempite per 2/3 (circa 20ml) con il mezzo di coltura sterile ancora liquido. Una volta solidificato il mezzo, le capsule sono state chiuse con parafilm e riposte capovolte in frigorifero a 4°C fino alla subcoltura degli embrioni.

Fase 3. Impianto dei semi e messa a coltura. L'escissione dell'embrione e l'impianto dei semi, è avvenuto anch' esso in ambiente sterile sotto cappa a flusso laminare utilizzando bisturi e lancetta che hanno agevolato la rottura dell'endosperma ed il prelievo degli embrioni. Questi ultimi sono stati quindi seminati nei quattro diversi terreni di coltura, distanziati tra loro all'interno delle capsule Petri, successivamente chiuse e sigillate con il parafilm.

Sono state preparate quattro piastre per tipologia di terreno, ognuna contenente 20 embrioni per un totale di 320 embrioni.

Condizioni di coltura

Le plantule sono state allevate in cella climatica ad una temperatura di 24° C. Otto piastre (due per tipologia di terreno) sono state allevate in cella al buio, condizione creata avvolgendole in carta stagnola, mentre le altre otto sono state sottoposte ad un fotoperiodo

di 16 ore di luce e 8 di buio e intensità luminosa di 20 W m^{-2} , per quattro settimane (con un trasferimento intermedio dopo 2 settimane delle plantule su nuovi substrati).

Gli embrioni germinati in vitro, che hanno raggiunto lo stadio di plantula, sono stati prelevati e sottoposti ai successivi trattamenti finalizzati alla visualizzazione dei cromosomi.

4.2. Metodi: tecniche molecolari e citogenetiche

4.2.1. Sonde per l'ibridazione *in situ*

Sonde rDNA

Per gli esperimenti di ibridazione fluorescente *in situ* (§2.1) sono state utilizzate le seguenti sonde a **rDNA**:

- 1) **TbITS**, rappresentante la sequenza di rDNA dell'ITS (*Internal Transcribed Spacer*) di *T. baccata* che comprende il gene 5,8S e gli spaziatori ITS1 e ITS2. La regione dello spaziatore interno trascritto è stata amplificata tramite PCR utilizzando una coppia di *primers* universali (D'Ovidio, 1992):

18S Fw- 5'- CGTAACAAGGTTTCCGTAGG - 3'

25S Rev -5'- CAGCGGGTAGTCCCGCCTGA - 3'

Il programma di amplificazione è stato il seguente (ITS A):

1 ciclo a 98°C x 3'

35 cicli a 98°C x 40'', 58°C x 40'', 72°C x 40''

1 ciclo a 72°C x 5'

- 2) **Tb5S**, rappresentante la sequenza di rDNA del 5S di *T. baccata*.

La sequenza del 5S è stata amplificata tramite PCR utilizzando la seguente coppia di *primers* basata sulle sequenze presenti in letteratura (Hizume, 1999):

5S_Pinae_F1_Hiz 5'- CCATCAGAACTCCGCAGTTA - 3'

5S_Pinae_R1_Hiz 5'- CGGTGCATTAATGCTGGTA - 3'

Tali *primers* sono stati disegnati utilizzando il software Primer3 disponibile in rete al sito internet http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. I parametri del software sono rimasti tutti invariati tranne: il “*Product size range*” impostato a 150-1000, il “*Primer Size*” impostato con il valore Minimo pari a 20, Ottimale 22 e Massima 24 e il “*Primer Tm*” con temperatura minima 59.0°C, ottimale 61.0°C e massima 63.0°C. Il programma di amplificazione utilizzato è stato identico a quello dell'ITS.

Le sequenze di TbITS e Tb5S sono state amplificate su DNA genomico di *T. baccata*, estratto grazie all'ausilio di un apposito kit commerciale (DNAeasy Plant Minikit, Qiagen) da foglie di un individuo campionato nel Lazio.

- 3) Accanto alle sequenze di rDNA amplificate nel corso della presente ricerca in tasso, per l'ibridazione *in situ*, è stata utilizzata come sonda anche la sequenza codificante per l'RNA ribosomiale 18S rappresentata dal clone pPD5 -isolato da *Populus* spp. – gentilmente fornito dal prof. Renato D'Ovidio (D'Ovidio *et al.*, 1991).

Per tutte le reazioni di PCR è stata allestita una soluzione il cui volume finale è stato di 25 µl, contenente 50 ng di DNA stampo di *T. baccata*, 20 ng di *primers* per reazione, una dose di *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* della Amersham. Le “*beads*”, sono un preparato commerciale liofilizzato contenente tutti gli elementi necessari per la reazione di amplificazione: enzima *Taq* polimerasi, buffer *Taq*, le basi ACGT ed inoltre è presente il Cloruro di Magnesio (MgCl₂) che funge da cofattore per l'enzima (per un volume finale di 25 µl ogni *bead* contiene 200 mM di dNTP in 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM di KCl, and 1.5 mM di MgCl₂) ed acqua quanto basta per raggiungere il volume desiderato.

Sonde di DNA altamente ripetute

In aggiunta alle sonde a rDNA, sono state testate sonde di sequenze di DNA altamente ripetute che presentano, secondo quanto riportato in letteratura, in altre specie di conifere, un pattern caratteristico.

In dettaglio si sono sperimentate le amplificazioni su DNA genomico di *T. baccata* e di *Picea abies* (DNA precedentemente estratti e conservati presso il laboratorio di Genetica ed Ecologia Forestale del dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia), due cloni cui si fa riferimento nel lavoro del 2001 di Vischi su *P.abies*:

- 1PABCD6: sequenza che in *P.abies* ha ibridato su sei siti subtelomerici e due siti centromerici.
- PATR140: sequenza che in abete mostra un segnale centromerico su tre coppie di cromosomi.

Partendo dalle sequenze nucleotidiche dei cloni 1PABCD6 e PATR140, entrambe disponibili in rete in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), è stato possibile disegnare i seguenti *primers*, mediante il software Primer3 (vedi sopra):

Patr140_Fw 5' - ACAGAGAGTATTTACTTAGCA -3'

Patr140_Fw2 5' - AGCTGCGGGTTATGCTTTC -3'

Patr140_Rev 5' - AATTGCGAGATCTATTAACCC - 3'

PABCD6_Fw 5' – GAATGCACACCCATAAGTTAGC -3'

PABCD6_Rev 5' – CGTAGCAAAGATGAGTCGTGTT -3'

Per l'amplificazione della sequenza 1PABCD6 è stato utilizzato il seguente programma di PCR sia su DNA genomico di tasso comune che di abete rosso:

1 ciclo a 98°C x 3'

35 cicli a 98°C x 40'', 58°C x 1'', 72°C x 40''

1 ciclo a 72°C x 5'

Per l'amplificazione della sequenza PATR140 è stato utilizzato il seguente programma , variando di volta in volta le combinazioni di *primers*:

1 ciclo a 94°C x 3'

45 cicli a 94°C x 40'', 58°C x 1', 72°C x 40''

1 ciclo a 72°C x 5'

Inoltre, in prove successive, è stato testato un gradiente di temperatura di annealing da 52°C a 55°C.

Per l'amplificazione di PATR140 e 1PABCD6, è stato utilizzato il prodotto Go Taq Green Master Mix della Promega (cat#M7112).

Sonde di retrotrasposoni

Le sequenze di retrotrasposoni LTR dei due tipi Ty1 copia-simili (*copia-like*) e Ty3 gypsy-simili (*gypsy-like*), ricercate nel presente lavoro sul genoma di *T. baccata*, sono state individuate mediante una ricerca bibliografica. Nello specifico sono state disegnate le seguenti coppie di *primers*, mediante il software Primer3, partendo dalle sequenze di retrotrasposoni di conifere (Friesen *et al.*, 2001 e Murray *et al.*, 2002) disponibili in banca dati:

Tb-gyINT_Fw 5'- GGATAATGACCTCTTTGACCAAGT -3'

Tb-gyINT_Rev 5'- GAGAGTTTGCAATACAATCCTGAG -3'

Tb-coINT_Fw 5'- CCGCTTGGGTATGAAGTCAA -3'

Tb-coINT_Rev 5'- CCAGGCTCATGCATAGGAGT -3'

Le indicazioni sulla composizione, le concentrazioni della mix di PCR ed i dettagli circa i programmi utilizzati per l'amplificazione delle sequenze di retrotrasposoni, sono presenti nel sito internet del prof. Helsop Herrison nel quale sono descritti metodi e protocolli sull'ibridazione *in situ* (nello specifico si è fatto riferimento alla pagina web relativa ai retrotrasposoni <http://www.le.ac.uk/bl/phh4/retros.htm>). Come suggerito dai protocolli disponibili on line, per le PCR è stato utilizzato un gradiente della temperatura di melting che parte da una temperatura di 39°C e raggiunge i 45°C. In aggiunta è stato sperimentato un ulteriore protocollo di amplificazione con un gradiente di temperatura di melting che comprende le temperature da 50°C a 62°C ed un numero di cicli che varia da 35 a 45. In questa occasione sono state testate la HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase (Quiagen, cat#203603) e la GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, cat#M7112).

Per tutte le reazioni di PCR gli amplificati prodotti sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio in 1xTBE (Tris 89mM, boric acid 89 mM, EDTA 2mM), a concentrazione variabile in relazione alla taglia dei frammenti di amplificazione (dall'1% al 3%).

L'agarosio utilizzato è stato di due tipi, uno per l'uso di routine, e il MetaPhorR (Cambrex Bio Science, Rockand Inc., USA), per la separazione di bande aventi poche paia di basi di differenza.

Il rilevamento è stato effettuato, dopo corsa elettroforetica, tramite colorazione con *GelRed*TMNucleic Acid Gel Stain (Biotium) (0.5 ìg/ml). L'immagine agli UV è stata acquisita e analizzata tramite il software KODAK 1D.

SSRs: sonde di microsatelliti

Questo tipo di marcatori, detti anche SSR (Simple Sequence Repeats), rappresenta un valido strumento in lavori di mappatura, sia per la loro numerosità e ampia distribuzione nei genomi di tutti gli Eucarioti, sia per l'elevato grado di polimorfismo che li caratterizza. In seguito ad una ricerca in letteratura degli SSRs, già mappati sul genoma di frumento (Cuadrado, 2010), sono state selezionate sonde costituite da microsatelliti, ovvero corti oligonucleotidi (SSRs), aventi marcature finali con fluorofori tipo FITC o CY3. Tali sonde sono state utilizzate, sia singolarmente sia in esperimenti di doppia ibridazione, al fine di verificare eventuali patterns di ibridazione su preparati metafisici di *T. baccata*.

Di seguito (Tab. 4.2) sono riportate le sigle degli oligonucleotidi sintetici utilizzati per le ibridazioni su preparati metafisici di *T. baccata* rispettivamente marcati con il fluorocromi CY3 o FITC.

Tabella 4.2. Elenco delle sonde microsatelliti SSRs utilizzate su vetrini metafisici di *T. baccata*.

SONDA	[] delle stock solution
AAC5-Cy3	100ng/μl
CAT5- Cy3	100ng/μl
AAT7-Cy3	100ng/μl
(TTAGGG) _n -Cy3	100ng/ul
GAA-Fitc	50ng/μl
AT ₁₂ - Cy3	1μg/μl
AG ₁₂ -Cy3	1μg/μl
ACT ₅ - Fitc	1μg/μl
GAA-Cy3	700ng/μl
5'-Fitc-GT ₁₁ -Fitc-3'	100ng/μl
GA ₁₀ -Cy3	100ng/μl

4.2.2 Ottenimento dei preparati citologici

Le analisi di cromosomi somatici di *T. baccata* sono state effettuate per la maggior parte partendo da apici radicali, prelevati da talee radicate di lunghezza variabile da 0.2 cm a 10 cm, meristemi ricchi di cellule in attiva divisione. Alcune sperimentazioni con agenti inibitori del fuso e induttori della contrazione dei cromosomi sono state testate anche sugli apici caulinari e sulle plantule germinate (§5.2.2).

- a) *Sincronizzazione del ciclo cellulare, arresto delle cellule in metafase e la contrazione dei cromosomi.* Sugli apici radicali di tasso sono stati testati i seguenti agenti inibitori del fuso mitotico e agenti sincronizzanti a diverse concentrazioni e tempi:

- Colchicina (Sigma) 0.05 % w/v;
- 1-bromo-naphthalene (Sigma) in una soluzione satura;
- ghiaccio.

Gli apici sono stati immersi nei diversi agenti per i seguenti tempi di trattamento: 0h-20h-24h-26h-27h-28h-30h-48h) e mantenuti al buio.

-APM (amiprophos-methyl) alle concentrazioni di 2,5mM e 5 mM, sperimentando diversi tempi di trattamento (4h-6h-24h). Gli apici immersi in APM sono stati mantenuti per la durata del trattamento al buio ad una temperatura di 24°C.

Successivamente al trattamento con gli agenti inibitori, gli apici sono stati ulteriormente trattati con ghiaccio fondente per circa 24h, allo scopo di accumulare cellule in metafase.

- b)** *Fissaggio*: al termine dei trattamenti il materiale vegetale viene fissato in una soluzione 3:1 di alcool etilico e acido acetico (Carnoy) per almeno qualche ora o preferibilmente per circa una settimana a temperatura ambiente. In tale soluzione il materiale può essere mantenuto per parecchi mesi a 4°C o, per tempi più lunghi e per una migliore fissazione, a -20°C, provvedendo periodicamente alla sostituzione del Carnoy.
- c)** *Preparazione dei vetrini*: la procedura a cui sono sottoposti gli apici in questa fase è differente a seconda dello scopo dell'analisi microscopica, ovvero analisi di routine come determinare il N° cromosomico della pianta o invece preparare i cromosomi all'ibridazione *in situ*. Nel primo caso si procede con la metodica di Feulgen, che viene riportata di seguito con le modifiche applicate nello specifico sugli apici radicali di *T. baccata*.

Protocollo per la visualizzazione di cromosomi somatici in *Taxus baccata* con colorazione Feulgen:

- Rimozione del Carnoy.
- Idrolisi in HCl 1N a 60°C.
- Trattamento degli apici in immersione con il reattivo di Shiff, per 1-2h controllando la colorazione del meristema apicale dell'apice.
- Trattamento con pectinasi 2% (Sigma) in tampone citrato 1x per 25' a 35°C.
- Sostituzione della pectinasi con acqua demineralizzata.

Infine si procede alla preparazione dei vetrini, che viene eseguita allo stereo microscopio per facilitare la procedura di dissezione dell'apice. L'apice è posto sopra il vetrino portaoggetto, aggiungendo una goccia di acido acetico 45% (oppure una goccia di soluzione di aceto carminio all'1%), si seziona la cuffia radicale (2-3 fettine della regione colorata), si copre il tutto con il copri-oggetto procedendo poi con l'asciugatura dell'eccesso di liquido con carta bibula e con altre lavorazioni per spargere uniformemente il preparato. Nel caso in cui si voglia conservare il vetrino, il preparato viene fissato, prima congelandolo rapidamente, su ghiaccio secco (CO₂ a -80°C; solida) e, fatto saltare il copri-oggetto, sottoponendolo a tre lavaggi in etanolo al 70-90-100% (ognuno di 3'), chiudendo infine il vetrino con la resina Euparal e apponendo un copri-oggetto. Per la preparazione dei vetrini destinati all'ibridazione *in situ* gli apici vengono prelevati dal Carnoy e sottoposti a due lavaggi consecutivi, rispettivamente di 5' e 20' in tampone di digestione

(vedi di seguito) ed incubati a 37°C per un periodo variabile da 50' a 90'a seconda della freschezza del materiale biologico trattato.

Tampone e soluzione enzimatica

Tampone di digestione:

75 mM KCl e 7.5 mM EDTA.

pH 7: Stock solution 1M KCl

Soluzione enzimatica:

2% (w/v) Cellulasi (Sigma)

2% Pectinasi liquida (Sigma)

In alternativa alla digestione enzimatica si possono porre gli apici in una soluzione di aceto carminio all'1% (carminio acetico al 50% diluito con acido acetico al 45%) per almeno 1h a 37°C). Al termine del trattamento di digestione gli apici sono lavati con il tampone e quindi utilizzati per la preparazione dei vetrini. Avvalendosi dello stereomicroscopio gli apici sono posti su vetrini portaoggetti, immersi in una goccia di soluzione di acido acetico 45% e picchiettati in modo che le cellule del meristema fuoriescano dalla cuffia radicale e si disperdano nella soluzione. Le cellule sono poi coperte con un vetrino copri-oggetto, lavorando in modo da ridurre le sovrapposizioni tra le cellule e tra i cromosomi. Infine le cellule vengono fissate ponendo il vetrino su una lastra di ghiaccio secco per 10-15 minuti e rimosso il copri oggetto. Il preparato è quindi pronto per l'ibridazione.

In caso di trattamenti con l'aceto carminio, dopo aver rimosso il coprioggetto, il vetrino viene sottoposto a due lavaggi in acido acetico al 45% (uno a temperatura ambiente e l'altro a 50°C) e lasciato asciugare all'aria; questo può essere poi osservato al microscopio in contrasto di fase, in modo da registrare quando possibile le coordinate delle cellule da ricercare per l'analisi dopo l'ibridazione. Il preparato può essere conservato a +4°C (o a -20°C per periodi più lunghi) fino al momento dell'uso.

4.2.3 FISH: *Fluorescent In situ Hybridization*

4.2.3.1 Marcatura delle sonde

Le sonde utilizzate sono state marcate con digossigenina o con biotina tramite *Nick translation* (Rigby *et al.*,1977) o mediante PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki *et al.*, 1988).

Marcatura della sonda mediante amplificazione PCR.

Tale metodologia permette di amplificare e contemporaneamente marcare sonde di lunghezza non superiori a 4kb. Il metodo in sintesi consiste nel sottoporre una miscela contenente il DNA sonda, nucleotidi marcati e non marcati, oligonucleotidi con sequenza corrispondente alle regioni fiancheggianti la sequenza da amplificare (*primers*) e la Taq polimerasi, ad una serie di cicli di temperature. Questi comportano dapprima la denaturazione del DNA stampo, poi il legame dei *primers*, che innescano su ciascuna delle due singole eliche in direzione 5'→3' la sintesi, catalizzata dalla Taq polimerasi, di nuove catene di DNA, contenenti anche il nucleotide marcato. Il metodo di marcatura tramite PCR é stato impiegato per la sonda **Tb5S** . Il protocollo seguito é stato il seguente:

Tampone per PCR 10x	10 µl
MgCl ₂	3 µl
dATP, dCTP, dGTP 10mM	0.5 µl ognuno
dTTP 1mM	4,5 µl
Digossigenina-11-dUTP-fitc 0,008mM	6,25µl
Primer Fw 2µM	10µl
Primer Rev 2µM	10µl
DNA stampo	1µl
Taq polimerasi (5U/µl)	0.5µl
acqua distillata deionizzata sterile	q.b. per arrivare a 100µl totali di miscela

La miscela così composta è stata sottoposta a cicli di temperature nel cicizzatore termico (PT-100, MJ Research Inc.) secondo il seguente programma:

- 1 ciclo a 2' a 94°C,
- 45 cicli a 30'' a 94°C; - 30'' a 58°C; 1' a 72°C,
- 4°C fino alla sua purificazione.

Marcatura mediante Nick Translation.

Questa procedura prevede l'uso dell'enzima DNAsi I, che in presenza di Mg^{++} produce rotture indipendenti (*nicks*) su ciascuno dei due filamenti della doppia elica di DNA, e della DNA polimerasi I, che a partire da tali *nicks* polimerizza in direzione 5'→3' un nuovo filamento incorporando i nucleotidi presenti nella reazione, tra cui quelli modificati (legati alla biotina o alla digossigenina). Tale tipo di marcatura é stato impiegato per le sonde **TbITS** e **Tb5S PABCD6** e **pPD5**. Nel caso della presente ricerca, sono stati utilizzati per la marcatura dei DNA sonda, sia il nucleotide modificato biotina-11-dUTP (Fermentas) che digossigenina-11-dUTP (Roche) nel rapporto di 5:1 tra dUTP modificato e dTTP. La molecola legata alla base modificata sarà riconosciuta dal corrispondente anticorpo (coniugato ad un fluoroforo) nella fase di rilevamento. La reazione di marcatura tramite *nick translation*, per l'incorporazione dei nucleotidi legati a digossigenina e a biotina, è stata eseguita seguendo le quantità e le concentrazioni dei reagenti riportati di seguito in Tab.4.3.

Tabella 4.3. Miscela per la marcatura tramite *nick translation*

Composto	Volume	Conc. Finale
DNA (5-10Kbp)	µl variabili (1µg)	20 ng/µl
Reaction Buffer 10X	2,5 µl	1X
d(GAC)TP mix 0,4 mM	0,5 µl	0,02 mM
dTTP 1mM	1 µl	0,004mM
Dig-11-dUDP/ Bio-11-dUDP 1mM	0,5 µl	0,02mM
DNasi I, RNasi-free 0,002U/ µl	1 µl	0,002U
DNA Polimerasi I, <i>E.coli</i> (10U/ µl)	1 µl	20U
H ₂ O distillate	Fino a 25 µl	

La miscela di reazione così costituita viene tenuta in incubazione a 15 °C per 2 h. Il blocco della reazione avviene denaturando gli enzimi mediante un trattamento della miscela di 15' a 65°C o aggiungendo 1 µl di EDTA 0,5 M pH 8.

Successivamente viene effettuato il controllo delle dimensioni dei frammenti marcati mediante Nick Translation, caricando 3 µl della miscela di reazione su gel di agarosio 1,5%. Qualora fossero di dimensioni maggiori di 500 bp, la reazione può essere protratta sino all'ottenimento delle idonee dimensioni.

L'incorporazione nella sonda della digossigenina-dUTP o della biotina-11-dUTP è verificata tramite la reazione colorimetrica Dot blot .

Purificazione della sonda. Il DNA marcato viene purificato aggiungendo 1/10 del volume di NaAc 3 M, 2 volte e mezzo il volume di EtOH 100%. Dopo aver mescolato per inversione e incubato a -80°C per 60', si procede alla centrifugazione a 13000 rpm per 30 min a 4°C. L'EtOH viene rimosso, il pellet viene lavato con EtOH 70% e centrifugato nuovamente a 13000 rpm per 10-15' a 4°C. Il surnatante viene eliminato e il DNA viene risospeso in H₂O.

4.2.3.2 Pretrattamenti dei preparati citologici

a)Trattamento con RNAasi. Tale trattamento è necessario per eliminare segnali di sottofondo dovuti a ibridazione tra sonda marcata e RNA cellulare. Allo scopo, si prepara dapprima una soluzione stock di RNAasi 10 mg/ml in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 e NaCl 15 mM. Si fa bollire la soluzione per 15', lasciandola poi raffreddare prima di aliquotarla (si conserva a -20°C). La soluzione di lavoro si prepara diluendo 1:100 la soluzione stock in tampone 2xSSC (0.3 M Na-citrato, 0.3 M NaCl) per ottenere una concentrazione d'uso di 100 µg/ml. 100µl di tale soluzione vengono posti su ciascun preparato citologico, incubato poi per 1 ora a 37°C. Trascorso tale tempo, i vetrini sono lavati tre volte per 5' in 2xSSC. Successivamente il vetrino viene trattato in camera umida con una soluzione di pepsina con una soluzione di circa 250 µl per vetrino (partendo da una soluzione stock 500 µg/µl in HCl 0.01 N) a 37°C per 10' e lavato due volte per 5' in PBS 1x (tampone fosfato salino, 1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄) a temperatura ambiente.

b) Fissazione con paraformaldeide. Una volta che i vetrini si sono asciugati, vengono trattati con una soluzione acquosa di paraformaldeide al 4% (w/v). Tipicamente, 2g della sostanza vengono posti in 50 ml di acqua distillata. Per agevolare la solubilizzazione, la soluzione viene portata a 60°C, aggiungendovi 5 ml di soluzione di NaOH 0.4 M. Il pH viene poi portato alla neutralità con l'aggiunta di 10X PBS (tampone

fosfato salino, 1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30mM NaH₂PO₄), portando poi il tutto a volume. Si lascia raffreddare fino alla temperatura ambiente prima dell'uso. Il lavaggio con la soluzione (va preparata fresca, sotto cappa, prima di ogni esperimento) è effettuato in agitazione per 10' a temperatura ambiente. Dopo il trattamento i vetrini vengono lavati tre volte per 5' con 2xSSC oppure una volta per 5' in PBS 1X a temperatura ambiente.

c) Disidratazione. Si realizza sottoponendo i vetrini ad una serie di bagni in alcool etilico (3' in alcool 70% e 3' in alcool 100%), facendoli poi asciugare all'aria per almeno un'ora.

4.2.4 Ibridazione *in situ* con la tecnica della FISH

Successivamente ai pretrattamenti dei vetrini la sonda o la coppia di sonde, vengono unite nella medesima provetta con gli altri componenti della miscela di ibridazione.

Miscela di ibridazione. La miscela di ibridazione, la cui composizione dettagliata viene riportata di seguito (Tab 4.4), contiene generalmente formammide, solfato di destrano e sali, in concentrazione appropriata, in funzione cioè della stringenza richiesta dall'esperimento. Per variare le condizioni di stringenza, tuttavia, si tende in generale a modificare tali concentrazioni in fase di lavaggi post-ibridazione.

Tabella 4.4. Composizione miscela di ibridazione (25µl/vetrino)

Soluz. stock(conc. iniz.)	Quantità/vetrino	Conc. finale
Formammide (100%)	15µl	50%
Solfato di destrano (50%)	6µl	10%
20xSSC	3µl	2X
SDS (10%acqua)	0.3µl	0.1%
DNA di sperma di salmone (5mg/ml)	1.5µl	0.250 mg/ml
Sonda		100 ng
H ₂ O		q.b. a 25µl di volume finale

La presenza di formammide rende possibile condurre l'ibridazione a temperatura decisamente più bassa che in sua assenza, in un ambito che va da 25°C a circa 40°C, a seconda dei materiali e del grado di ripetizione della sequenza da localizzare. Il solfato di

destrano, poi, forma una trama che favorisce la concentrazione della sonda e quindi la reazione di ibridazione.

Denaturazione della sonda. La sonda marcata, contenuta nella miscela di ibridazione, è stata denaturata in un bagno termostatico a 70°C per 10', quindi posta in ghiaccio per 5', onde bloccare la reazione.

Denaturazione dei cromosomi e ibridazione. Dopo aver posto su ogni vetrino la miscela di ibridazione e quindi un coprioggetto di plastica, il DNA cromosomico viene denaturato ponendo i preparati in un cicizzatore termico apposito (PT-100, MJ Research Inc.), dove vengono sottoposti al seguente ciclo di temperature: 7' a 75°C, 2' a 55°C, 30" a 50°C, 1' a 45°C, 2' a 42°C, 5' a 40°C e 5' a 38°C. Raggiunta la temperatura di ibridazione di 37°C, i preparati vengono qui mantenuti tutta la notte (minimo 6 ore).

4.2.5 Lavaggi post-ibridazione e rilevamento

Lavaggi post-ibridazione. I lavaggi post-ibridazione sono necessari per eliminare l'eccesso di sonda marcata e per rompere i legami aspecifici tra sonda e DNA, in modo da ridurre i segnali aspecifici e di fondo. Tali lavaggi sono stati condotti ad un'alta stringenza ovvero in presenza di denaturanti chimici (20% formamide in 0.1x SSC a 42°C), in condizioni di basse concentrazioni saline e elevata temperatura che non permettono di mantenere eventuali legami tra sequenze che non condividono un'elevata omologia tra sonda e bersaglio.

Eliminato il coprioggetto i vetrini sono stati sottoposti ai seguenti lavaggi:

- 1 x 5' in 2xSSC a 42°C
- 2 x 5' in 20% formamide in 0.1xSSC a 42°C
- 3 x 5' in 2xSSC a 42°C
- 3 x 5' in 2xSSC temperatura ambiente
- 1 x 5' in 4xSSC/0.2% Tween a temperatura ambiente.

Rilevamento. In base al tipo di marcatura, si distinguono di conseguenza due sistemi generali di rilevazione: uno diretto ed uno indiretto. Il primo si basa sul legame di un fluoroforo alla sonda a singolo filamento; il secondo si avvale invece di sistemi che sfruttano molecole intermedie, in grado di riconoscere i marcatori fissati sulla sonda (es. anticorpo-aptene, proteina-coenzima), che a loro volta possono essere appaiati o meno ad

enzimi di rivelazione (fosfatasi alcalina, perossidasi, β -galattosidasi. (Gentilomi,1990; Guesdon, 1992; Girotti *et al.*, 1991).

- Rilevamento indiretto

Nel caso della marcatura indiretta (il nucleotide marcato non è direttamente legato ad un fluorocromo), per poter visualizzare il segnale delle le sonde i vetrini vengono sottoposti ad un trattamento con anticorpi coniugati a fluorocromi.

Sui vetrini metafisici vengono messi 100 μ l di una soluzione di 0.5%XBR in 4XSSC/Tween, coperti con un copri oggetto in plastica e lasciati incubare per 5' a temperatura ambiente.

Rimossa la soluzione in eccesso si prepara la miscela di rilevamento con un volume finale di 50 μ l per vetrino secondo i volumi riportati in Tab 4.5:

Tabella 4.5. Miscela di rilevamento indiretto

Composto	Quantità/vetrino
0.5% BR in 4XSSC/Tween	45 μ l (o 50 μ)
Anti-DIG FITC (verde-Digossigenina)	5 μ l
Streptavidina CY3 (rosso-Biotina)	0,00625 μ l

- 5 μ l di anti-digossigenina-FITC per rilevare le sonde marcate con digossigenina-11-dUTP. Il FITC (isotiocianato di fluoresceina, Boehringer) è caratterizzato da una fluorescenza nel verde (λ =525 nm);

- 0,0625 μ l di streptavidina-Cy3 che riconosce la biotina-11-dUTP incorporata nella sonda.

Il fluorocromo Cy3 (Amersham Pharmacia) emette nel rosso (λ =570 nm).

Si appone infine il copri-oggetto di vetro e si tiene a 37°C, in camera umida, per 1h. I vetrini al termine dell'incubazione sono sottoposti a tre lavaggi, da 3' l'uno, in 4xSSC /Tween a 37 °C.

Per la colorazione della cromatina “di fondo” (controcolorazione) è stato usato il DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindolo), contraddistinto da fluorescenza blu (λ =450 nm). A tale scopo sono posti 30 μ l di Antifade (Vector H 1000 Vectashield), un composto che consente di preservare più a lungo la fluorescenza, in cui viene precedentemente disciolto 0,5 μ l di DAPI (200 μ g/ml; conservato a -20 °C).

I vetrini vengono nuovamente chiusi con coprioggetto di vetro e messi al buio a 4 °C, prima dell'osservazione al microscopio ad epifluorescenza.

- Rilevamento diretto della sonda marcata con fluorocromi

L'impiego di sonde marcate con fluorocromi rende molto rapidi i passaggi che seguono l'ibridazione, in quanto la visualizzazione al microscopio non necessita di reazioni intermedie. Dopo i lavaggi si procede direttamente alla colorazione della cromatina “di fondo” (controcolorazione) con il DAPI (si seguono le stesse procedure descritte per il rilevamento indiretto).

4.2.6 Reibridazione dei preparati microscopici.

Dopo un lavaggio in 2xSSC/Tween a temperatura ambiente per circa 2 ore con agitazione, i preparati microscopici possono essere sottoposti ad una o più ibridazioni successive, con le stesse o diverse sonde. La procedura di reibridazione è sostanzialmente la stessa impiegata per la prima ibridazione, rispetto alla quale vengono però omessi il trattamento con RNAasi e la fissazione in paraformaldeide. Naturalmente la qualità dell'ibridazione viene via via meno all'aumentare del numero di reibridazioni (la seconda e la terza sono tuttavia in genere da buone a discrete). I lavaggi tra un esperimento e l'altro possono essere variati in tempi e temperatura a seconda della qualità dei preparati e del tipo di sonde da reibridare (se sono le stesse del precedente esperimento, non è necessario un lavaggio "energico").

4.2.7 Ibridazione con SSRs (ND-FISH)

La marcatura testata con oligonucleotidi sintetici (SSRs) legati a specifici fluorocromi è avvenuta in condizioni non denaturanti, da cui il nome ND-FISH. Tale tecnica, sviluppata in Spagna da A.Cuadrado (Cuadrado *et al.*, 2010), è stata migliorata nella sua efficacia sino a risultare un procedimento facile e veloce che abbatta notevolmente i tempi di effettuazione ed i costi delle procedure classiche.

Gli SSRs utilizzati nella presente ricerca sono stati in parte gentilmente concessi dalla Dott.ssa Debora Giorgi (ENEA –Roma) e in parte acquistati dalla ditta Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) . Gli oligonucleotidi sintetici acquistati in forma di liofilizzati, vengono risospesi in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) in modo da avere una concentrazione di 1 µg/µl). Per le ibridazioni è stata utilizzata una quantità di sonda di 50-100ng di sonda per vetrino.

Protocollo ND-FISH

- Preparare in una eppendorf (coperta da un foglio di alluminio per evitare che la luce danneggi i fluorocromi) una soluzione di 2XSSC nella quale si aggiunge l'oligonucleotide legato al fluorocromo, o la coppia di SSRs selezionati come sonde per l'ibridazione ND (come detto in precedenza, è necessaria una quantità minima pari a 50 ng di sonda per vetrino).
- Si aggiungono quindi su ogni vetrino 30 µl di soluzione di ibridazione.
- Coprire i vetrini con un copri oggetto in plastica.
- Lasciare i vetrini in incubazione con la soluzione di ibridazione al buio per 60' a temperatura ambiente.
- Dopo l'incubazione si effettuano due lavaggi successivi , il primo di 5' in 2xSSC e un secondo lavaggio di 5'in 4XSSC/0.2% Tween.
- Aggiungere come controcolorazione della cromatina 20 µl di DAPI 1x preparato in una soluzione di Antifade (vedi sopra quanto descritto per il rilevamento indiretto).
- Dopo aver coperto il vetrino con un copri oggetto in vetro, si osservano i preparati al microscopio a fluorescenza.

Nel caso di reibridazione i vetrini vengono trattati con una soluzione PBS 1X in agitazione a temperatura ambiente per minimo di un'ora fino a tutta la notte. Una volta

sfilato il copri oggetto con una pinzetta, si rimpiazza la soluzione di PBS viene con una soluzione di 4x SSC/ Tween nella quale i vetrini vengono lasciati in agitazione per 5'a temperatura ambiente. Dopo essersi asciugati i vetrini sono pronti per l'ibridazione.

4.2.8 Tecniche di bandeggio con fluorocromi

Sono state testate inoltre su vetrini metafasici tecniche di bandeggio cromosomico con Chromomycin A3 (CMA, Sigma) in singolo e sequenzialmente con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e secondo Schwarzacher *et al.* (1976) :

La CMA (stock solution 2 mg/ml) è stata risospesa in etanolo e sono stati sperimentati i seguenti trattamenti:

1. Contro-colorazione diretta dei vetrini con CMA 50 µg/ml.
2. Doppia contro-colorazione diretta dei vetrini con i fluorocromi CMA (40 µg/ml) e DAPI (2 µg/ml).
3. Colorazione dei vetrini trattati con una soluzione di CMA (0.1 mg/ml) disciolta nel tampone McIlvaine pH 7,0 a cui è stato aggiunto MgCl₂ (5mM). I vetrini sono stati incubati a temperatura ambiente per 15' e poi lavati in 4xSSC/0.2% Tween prima della loro osservazione.

4.2.9 Microscopia ad epifluorescenza ed acquisizione computerizzata delle immagini

L'osservazione dei vetrini al microscopio ad epifluorescenza (Leica DM5000) viene effettuata dopo alcune ore, quando i fluorocromi risultano sufficientemente protetti contro il fenomeno di decadimento della fluorescenza. I siti di ibridazione vengono visualizzati scegliendo gli opportuni filtri per epifluorescenza ed utilizzando obiettivi apposti ad olio per immersione che non diano interferenze. Il DAPI, legandosi alle basi adenina e timina, mette in evidenza tutto il materiale cromatinico, non discriminando le eventuali diversità intergenomiche /interspecifiche, ma permettendo, già a basso ingrandimento, l'individuazione delle cellule di interesse.

A causa della rapida perdita del segnale, dovuta all'esposizione alla luce di eccitazione, i preparati non sono studiati direttamente al microscopio. Le immagini delle cellule selezionate, infatti, sono captate tramite un sistema di acquisizione e analisi di immagini, composto da una telecamera raffreddata ad alta sensibilità e risoluzione SPOT collegata al microscopio, ed un computer per l'elaborazione e l'analisi delle immagini catturate dalla telecamera, procedure eseguibili in tempi successivi all'esperimento. L'acquisizione, l'elaborazione e l'archiviazione delle immagini sono state effettuate mediante vari software, rispettivamente tra cui ImageJ e Picasa, che funzionano in ambiente Windows.

4.2.10 Misure morfometriche e classificazione dei cromosomi.

Analizzando le immagini ottenute dallo “squash” delle metafasi di *T. baccata* è stato possibile effettuare delle misurazioni morfometriche (lunghezza totale dei bracci e arm-ratio) dei cromosomi utilizzando appositi programmi informatici come ImageJ, Image J 1.34s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), e Chias (Kato, 2009).

5 Risultati

5.1 Risultati della propagazione vegetativa di *T. baccata*

5.1.1 Radicazione di talee legnose

Il primo obiettivo raggiunto nella presente ricerca, è stata la radicazione delle talee messe a dimora nel dicembre 2010, con una percentuale di sopravvivenza del 70%. Lo sviluppo dei primi apparati radicali si è osservato nel giugno 2011 con una percentuale di radicazione del 33% (Fig. 5.1). Le talee, sebbene cresciute in modo disomogeneo, presentavano apici radicali in attiva crescita di lunghezze variabili ma distinguibili perché bianchi, più spessi e vigorosi rispetto ad altri che si presentavano gialli e/o marroncini, più vecchi.



Figura 5.1. Talee legnose radicate di *T. baccata* (giugno 2011).

Tali apici sono stati prelevati, trattati e schiacciati sui vetrini (§4.2.2.).

5.1.2 Propagazione vegetativa degli apici caulinari

Le talee erbacee di *T. baccata*, conservate in vasetti nelle celle climatiche, hanno registrato delle condizioni ottimali di accrescimento “controllato”, osservate nell’arco di una ventina di giorni. In base allo stadio di sviluppo degli apici vegetativi sono state identificate tre fasi di accrescimento delle gemme e di ingrossamento delle perule (Fig.5.2):

1) gemme chiuse o marroni, ovvero gemme con perule dure e chiuse di colorazione marrone scuro (lunghezza massima di 0.5 cm).

2) gemme “in burst” o bianche: sono letteralmente gemme “in esplosione”, caratterizzate da un ingrossamento foglie squamiformi leggermente aperte, lasciando trasparire nel centro dell’apice tra le punte delle perule una colorazione bianca tendente al verde (con un range di lunghezza da 0.5cm a 1cm).

3) gemme in fase di allungamento o verdi: sono gemme ormai “già esplose” aventi ben evidenti i nuovi tessuti vegetativi in fase di distensione e allungamento (lunghezza maggiore o uguale ad 1 cm).

Nelle figure seguenti sono descritte le tre tipologie di gemme che sono state successivamente utilizzate per la visualizzazione dei protoplasti.

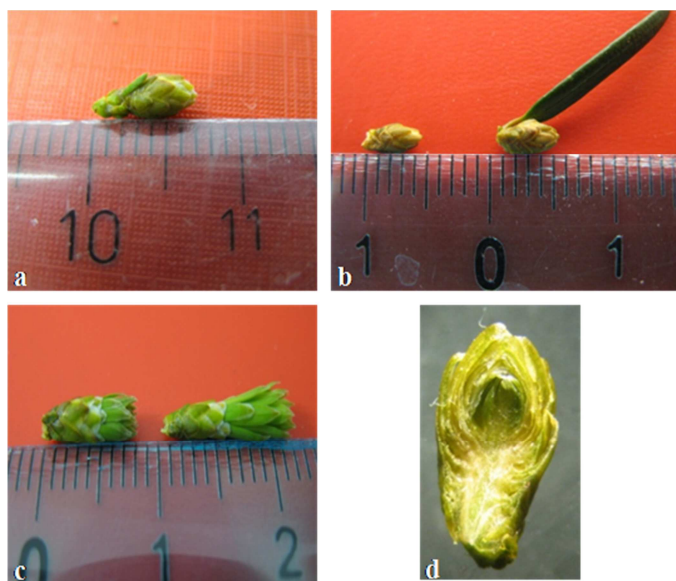


Figura.5.2. Gemme di *T. baccata*: a) gemme marroni o chiuse; b) gemme “in burst” o in esplosione; c) gemme verdi o in allungamento; d) dettaglio di una sezione trasversale di una gemma “in burst”.

5.1.3 Micropropagazione *in vitro*

Sebbene la scarificazione meccanica dei tegumenti dei semi di *T. baccata*, abbia inficiato le condizioni di sterilità nella messa a coltura degli embrioni, le percentuali d'inquinamento e di germinazione degli embrioni non si sono diversificate molto al variare dei substrati (presenza/assenza dei nutrienti nei terreni di coltura), e condizioni di luce o buio di allevamento degli espianti. L'inquinamento s'è in generale mantenuto su livelli bassi, di media un embrione contaminato per piastra (eccetto per il mezzo di coltura WPM+ADD, nel quale si è registrato probabilmente per contaminazione ambientale, il tasso più alto di inquinamento 12 embrioni su 20).

In generale le possibili fonti di inquinamento sono state: l'espianto, l'ambiente, il mezzo nutritivo, gli strumenti utilizzati nelle varie operazioni e l'operatore. La rimozione di frammenti di endosperma che circondano l'embrione, anch'essa potenziale fonte di inquinamento, è stata tuttavia indispensabile per evitare la contaminazione dell'espianto al momento dell'inizio della subcoltura. Tuttavia la sterilizzazione di superficie dei semi nudi probabilmente non ha eliminato contaminazioni interne di batteri patogeni o non patogeni. Infatti dopo alcuni giorni dalla semina degli espianti si sono evidenziate – sebbene in bassa percentuale- contaminazioni da funghi, facilmente identificabili per lo sviluppo di muffe (più difficile è stato il riconoscimento delle infezioni batteriche, perché solo alcune si evidenziano precocemente con la formazione di colonie ben delimitate sulla superficie del terreno, o di intorbidamento diffuso del substrato. Le più subdole si manifestano con aloni alla base dei germogli dopo 20 o più giorni dalla messa in coltura, perciò è possibile diffondere la contaminazione alle successive subcolture).

I risultati relativi alla coltura degli embrioni di *T. baccata* posti in differenti condizioni climatiche e nutrizionali sono illustrati nelle tabelle 5.1.a-b-c.

Da esse appare evidente che la bassa percentuale di germinazione non sia stata una diretta conseguenza di un elevato grado di inquinamento nelle piastre, bensì di un notevole numero di embrioni “quiescenti”, probabilmente rimasti immaturi (ovvero embrioni che non hanno superato la dormienza, oppure che non hanno beneficiato dei nutrienti presenti sui terreni di coltura come stimolo per avviare il normale loro sviluppo) o difettosi. Tali espianti hanno arrestato la loro crescita nel mezzo allo stadio di semina. Ciò si è registrato in particolare nel terreno MS + ADD, nel quale il 100% embrioni seminati (sia in condizioni di buio che di luce) sono rimasti quiescenti per di tutto il periodo allevamento. È necessario sottolineare che un rallentamento della crescita e della proliferazione dell'espianto potrebbe essere anche la conseguenza di una contaminazione latente.

Tabelle 5.1 a-b-c Risultati della micropropagazione *in vitro* in *T. baccata*, descritti al variare del substrato, in condizioni di buio e di luce. I dati sono stati raccolti dopo quattro settimane dalla messa in coltura.

Tab.5.1-a. Embrioni allevati in condizioni di buio

Mezzo di Coltura	EMBRIONI seminati per terreno	EMBRIONI contaminati per terreno	EMBRIONI quiescenti per terreno	% EMBRIONI quiescenti per terreno	EMBRIONI germinati per terreno	% PLANTULE ottenute per terreno
MS	20	0/20	11/20	55%	9/20	45%
MS+ADD	20	0/20	20/20	100%	0/20	0%
WPM	20	0/20	16/20	80%	4/20	20%
WPM+ADD	20	8/20	7/20	35%	5/20	25%

Tab.5.1-b. Embrioni allevati in condizioni di luce

Mezzo di coltura	EMBRIONI seminati per terreno	EMBRIONI contaminati per terreno	EMBRIONI quiescenti per terreno	% EMBRIONI quiescenti per terreno	EMBRIONI germinati per terreno	% PLANTULE ottenute per terreno
MS	20	0/20	11/20	55%	9/20	45%
MS+ADD	20	0/20	20/20	100%	0/20	0%
WPM	20	2/20	10/20	50%	8/20	40%
WPM+ADD	21	0/21	15/21	71,4%	6/21	28,5%

Tab.5.1-c. Tabella riassuntiva sulle percentuali di germinazione, contaminazione e quiescenza degli embrioni, dopo trenta giorni dalla loro semina.

Mezzo di coltura	% totale PLANTULE germinate per piastra (buio)	% totale PLANTULE germinate per piastra(luce)	% totale EMBRIONI quiescenti per terreno	% totale EMBRIONI contaminati per terreno	% totale PLANTULE Germinate per terreno
MS	45%	45%	55%	0	45%
MS+ADD	0%	0%	100%	0	0%
WPM	20%	40%	60%	10%	30%
WPM+ADD	25%	28,5%	53,2%	20%	26,8%

Le plantule hanno mostrato lunghezze e morfologia eterogenea (Fig5.3). Gli espianti germinati sono stati prelevati ed analizzati allo stereo microscopio. Gli apici meristematici sono stati trattati per le analisi citogenetiche.



Figura 5.3. Risultati micropropagazione: a sinistra si osserva una piastra con 20 embrioni di *T. baccata*, di cui 19 non ancora germinati e 1 che ha subito una contaminazione fungina. Nell'immagine a destra: una piastra con embrioni germinati, dalla quale sono state prelevate alcune plantule per le analisi citogenetiche.

In seguito ai risultati della micropropagazione *in vitro* degli espianti, sono stati effettuati i confronti tra i diversi mezzi di coltura utilizzati come substrati: 1) I terreni semplici, senza l'aggiunta di nutrienti, hanno mostrato un maggiore successo nella germinazione degli embrioni: il terreno MS semplice ha registrato la percentuale più alta di germinazione con il 45% di plantule germinate seguito da WPM con il 31%. 2) I terreni con l'aggiunta di nutrienti (MS + ADD e WPM + ADD) hanno registrato rispettivamente lo 0% e il 26,8% di espianti germinati. WPM + ADD ha evidenziato anche la percentuale più alta, pari al 20%, di contaminazione degli embrioni.

E' importante sottolineare inoltre gli effetti positivi del carbone attivo aggiunto nei mezzi di coltura. Soprattutto nelle specie arboree dove la produzione di tannini e altre sostanze fenoliche influenza negativamente la rizogenesi come *T. baccata* (Chang *et al.*, 2001, Pan e Staden, 1998), il ruolo del carbone attivo diviene fondamentale, in quanto esso assorbe le sostanze tossiche e favorisce l'emissione delle radici nel substrato.

5.2. Risultati delle analisi citogenetiche e molecolari

5.2.1 Visualizzazione dei cromosomi di *T. baccata* negli apici radicali provenienti da talee di due anni

Nell'arco del primo anno di dottorato, a partire dal mese di Gennaio 2011 (in attesa della radicazione delle talee messe a dimora nel novembre 2010), è stato sperimentato il trattamento di apici radicali di talee di due anni di età (Fig.5.4), disponibili presso il Vivaio Forestale Sperimentale dell'Università della Tuscia. Sono stati eseguiti vari trattamenti degli apici con diversi agenti bloccanti inibitori del fuso (colchicina – bromo naftalene) e diversi tempi di ghiaccio (§4.2.2), che tuttavia non hanno fornito risultati soddisfacenti relativamente al grado di contrazione e sovrapposizione dei cromosomi. Difatti le varie prove e combinazioni di trattamenti testati sui tessuti meristematici di tasso in maniera preliminare (replicati anche su gemme e plantule) non hanno fornito risultati significativi in quanto, nonostante il trattamento, la lunghezza dei cromosomi nelle cellule metafasiche trattate rimaneva imm modificata. In figura 5.5 sono riportate due metafasi di cellule di apici radicali di talee di due anni d'età trattati con colchicina a 1-bromonaftalene.



Figura 5.4. Apparati radicali di talee di *T. baccata* di due anni di età.

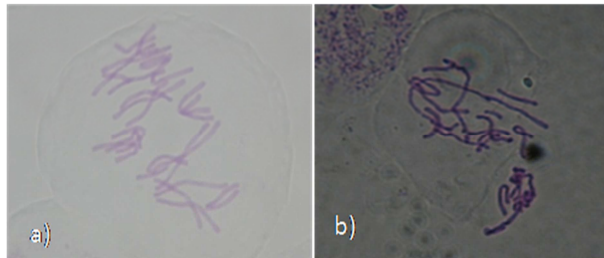


Figura 5.5. *Spreads* metafasici di *T. baccata* di cellule dell'apparato radicale di talee di due anni d'età. a) piastra metafase di apici radicali trattati in ghiaccio per 30h. b) piastra metafase di apici radicali trattati con una soluzione satura di 1-bromonaftalene. Colorazione Feulgen. Ingrandimento 100x Microscopio ottico.

5.2.2. Visualizzazione dei cromosomi di *T. baccata* negli apici caulinari e negli embrioni germinati *in vitro*

A) In seguito al monitoraggio degli apici caulinari di tasso in condizioni controllate sono state prelevate le gemme nei tre diversi stadi di accrescimento (gemme marroni, gemme *in burst* e gemme verdi o in allungamento). Su di esse è stato sperimentato il protocollo di preparazione dei protoplasti in apici caulinari riportato in Ananthawat-Jonsson, 2003 su *Betula pendula*. Tale tecnica, convalidata dalla

citogenetista come metodica alternativa alla digestione di cellule meristematiche provenienti da apici radicali (caratterizzate per la maggior parte delle angiosperme da metafasi con cromosomi troppo corti, diversamente dalle metafasi delle cellule meristematiche caulinari), ha come fine la preparazione di altro materiale di partenza, inteso come vetrini metafasici, per la sperimentazione dell'ibridazione *in situ* in *T. baccata*. Se da una parte si è riscontrato il successo di tale tecnica negli apici caulinari di tasso (relativamente alla buona qualità e quantità dei protoplasti digeriti per vetrino), d'altra parte le cellule metafasiche degli apici caulinari di *T. baccata* presentavano cromosomi troppo lunghi, sovrapposti, poco contratti e poco lavorabili attraverso lo schiacciamento per poter proseguire con le tecniche di ibridazione.

Come detto in precedenza, al fine ottenere una migliore contrazione dei cromosomi sono stati testati diversi agenti inibitori del fuso, precedentemente provati sugli apici radicali, anche sulle gemme nei tre stadi di accrescimento. Tali trattamenti non hanno avuto tuttavia successo, poiché le metafasi -come si apprezza dalle le immagini a e b in Fig 5.6- apparivano chiuse con cromosomi molto lunghi e elevato grado di sovrapposizione.

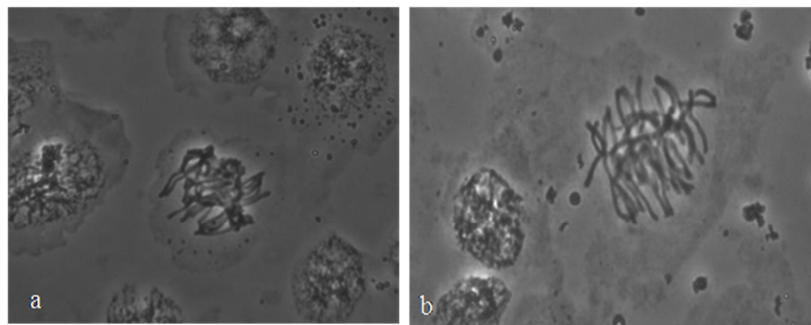


Figura 5.6. Cellule in metafase di apici caulinari di *T. baccata* . a) apice trattato con colchicina; b) apice che non ha subito alcun trattamento. Ingrandimento 80x- microscopio ottico, contrasto di fase.

B) Le plantule germinate, in seguito all'allevamento in condizioni controllate, sono state prelevate a diversi stadi di crescita, al fine di testare la qualità delle cellule metafasiche presenti nei meristemi. Le radichette delle plantule germinate, aventi grandezza eterogenea, sono state prelevate e sottoposte agli stessi trattamenti degli apici radicali e delle gemme. Tuttavia nonostante la diversità del materiale biologico (la plantula dovrebbe rappresentare, grazie alla sua elevata attività

meristemica, il materiale d'eccellenza per le analisi citogenetiche), non si sono registrati notevoli miglioramenti in merito alla qualità dei preparati citologici.

Sono stati testati i meristemi apicali nei tre stadi di accrescimento delle gemme, non verificandone differenza nell'indice mitotico. Bensì è stato riscontrato che le cellule degli apici caulinari esaminate, nonostante siano stati protoplasti, quindi privi di parete cellulare, sono parse piuttosto refrattarie all'apertura delle metafasi ed ai diversi tipi di trattamento enzimatico. Gli espianti germinati, sono stati testati anch' essi nei loro diversi stadi di crescita. Indifferentemente dalla loro stadio tutte le plantule erano caratterizzate da un tessuto apicale più morbido. Le radichette trattate si sono prestate ad una lavorazione migliore degli “squash” per la preparazione dei vetrini metafisici. Tuttavia anche in questo caso i trattamenti eseguiti sugli espianti non hanno fornito risultati soddisfacenti. Bisogna comunque sottolineare che per la sperimentazione della propagazione *in vitro* degli embrioni non si è allestito un esperimento di grandi numeri, quindi non si è avuto a disposizione un elevato numero di radichette a cui somministrare i diversi trattamenti (in totale si sono analizzate circa una quarantina di plantule di grandezza e morfologia eterogenea).

5.2.3. Visualizzazione dei cromosomi di *T. baccata* negli apici radicali provenienti da talee sette mesi d'età

In seguito alla radicazione delle talee nel giugno 2011, si sono ottenuti nuovi apici radicali di differente lunghezza e morfologia. Tuttavia grazie alla numerosità di questo materiale biologico, sono state effettuate ulteriori prove testando il trattamento degli apici con l'erbicida **amiprofos-methyl (APM)** inibitore della formazione del fuso mitotico, al fine di ottenere dei buoni preparati metafisici.

L'analisi al microscopio ottico degli “squash” di tali apici radicali, immersi per 6h in amiprofos-methyl 2,5µM (APM) ad una temperatura di 24°C, seguite da un trattamento in H₂O a 0°C per 24h e successivamente colorati con il metodo di Feulgen, ha mostrato come essi abbiano risposto in modo soddisfacente al trattamento con l'erbicida. La scelta dell'APM, si è dimostrata fondamentale per ottenere un elevato grado di contrazione dei cromosomi di *T. baccata* (al microscopio ottico appaiono più condensati e meno sovrapposti rispetto ai precedenti trattamenti con altri agenti), indispensabile per la FISH e la caratterizzazione morfometrica (risultati mostrati nelle figure successive 5.7 e 5.8)

5.2.4 Misure morfometriche e classificazione dei cromosomi

L'analisi al microscopio delle metafasi di apici radicali trattati con APM, ha rivelato una buona morfologia, intesa come grado di condensazione cromosomica.

In tutte le metafasi osservate è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=24$ (Fig.5.7) e 12 coppie di cromosomi, convalidando pertanto quanto noto in letteratura (Dark, 1932).

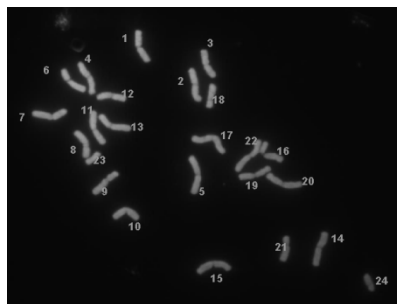


Figura 5.7. Cromosomi di *Taxus baccata* ($2n=24$) trattati per 6h a 24°C in APM 2,5 μ M e successivamente 24h in H₂O a 0°C. Osservati al microscopio a fluorescenza a 100x .

Sono state analizzate immagini di metafasi mitotiche provenienti da apici radicali di talee confrontando eventuali differenze cromosomiche tra individui maschi e femmine.

Da un'analisi morfologica non si sono apprezzate differenze tra i corredi cromosomici dei due sessi che presentavano una struttura alquanto simile (Fig.5.8).

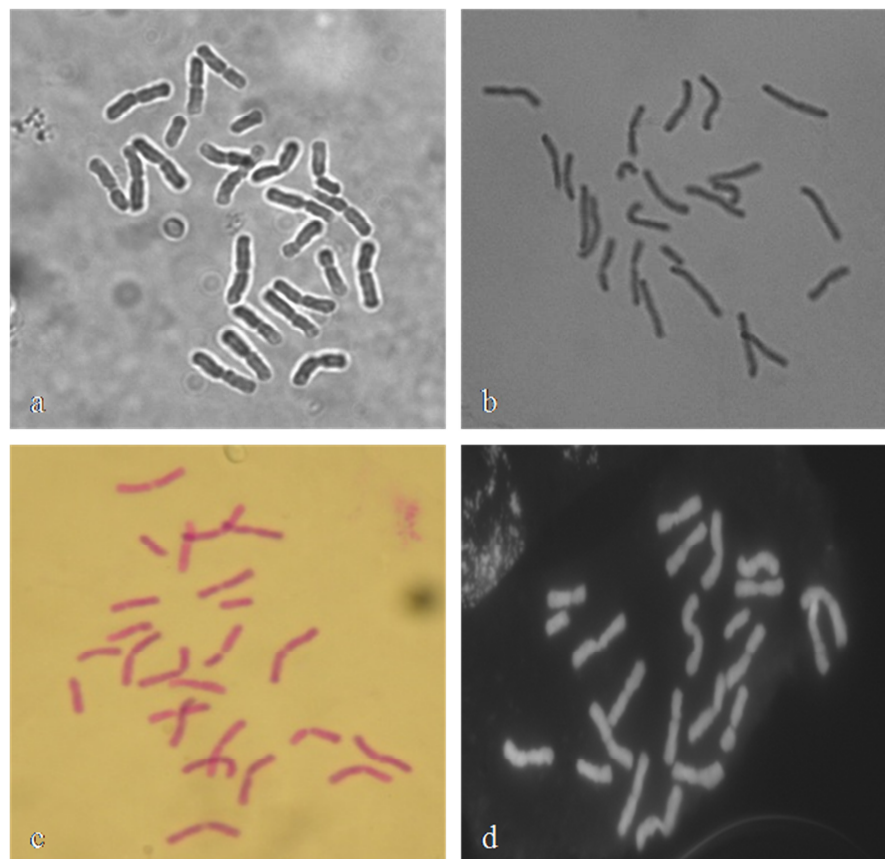


Figura 5.8. Cromosomi in metafase mitotica presenti in cellule di apici radicali trattati in immersione in APM 2,5 μm + 24h in ghiaccio. a) e b) sono rispettivamente cellule metafasiche di individui maschi mentre c) e d) provengono da individui di sesso femminile. a/b/d sono acquisite in contrasto di fase mentre c. in campo chiaro. In quest'ultima (c) acquisizione si apprezza la tecnica della colorazione con il reattivo di Schiff, che conferisce il colore fucsia ai cromosomi.

Analizzando le immagini ottenute dallo “squash” di metafasi di *T. baccata* è stato possibile effettuare delle misurazioni morfometriche (Fig.5.9) dei cromosomi utilizzando appositi programmi informatici come ImageJ Image J 1.34s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), e Chias (Kato, 2009). La lunghezza in micron dei cromosomi varia da un minimo di 3.7 ad un massimo di 9.5 μm .

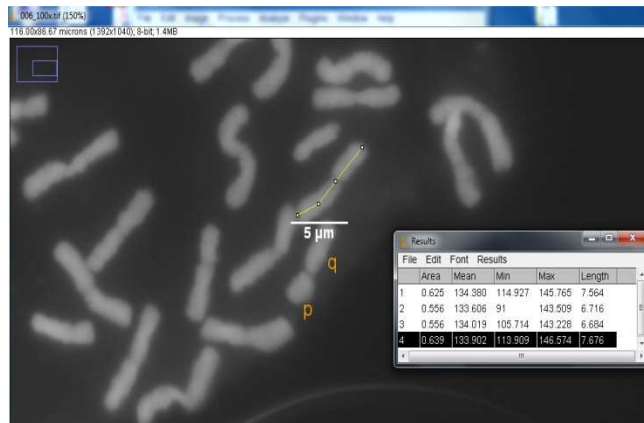


Figura 2.9 Immagine di cromosomi di *T. baccata* elaborata mediante il software Image J.

La terminologia fondamentale per i cromosomi fu decisa in un convegno a Parigi nel 1971 ed è spesso indicata come “nomenclatura di Parigi”. Convenzionalmente il braccio corto è indicato da una p (*petite*), e il braccio lungo con una q (*queue*). La posizione del centromero viene definita attraverso il **centromeric index** ossia il rapporto tra il braccio più corto e l'intera lunghezza del cromosoma. I cromosomi di *T. baccata* sono stati quindi classificati in base al loro rapporto bracci, q/p (arm-ratio), al fine di costruire un ideogramma e poter convalidare il cariotipo di *Taxus baccata* (Tab. 5.2).

Tabella 5.2. Rapporto bracci e classificazione in base alla posizione del centromero dei cromosomi di *T. baccata*. M= metacentrici, Sm= submetacentrici, A= acrocentrici.

N	Arm ratio (Rapporto bracci q/p)	Classificazione dei cromosomi
1	1-1.2	M
2	1-1.2	M
3	1-1.2	M
4	1-1.2	M
5	1-1.2	M
6	1-1.2	M
7	1.2-1.7	Sm
8	1.2-1.7	Sm
9	1-1.2	M
10	1-1.2	M
11	>1.7	A
12	>1.7	A

Le 12 coppie di cromosomi sono state quindi individuate in base al rapporto bracci suddivise in tre classi (Fig.5.10):

- 8 coppie di cromosomi **m** ovvero metacentrici (q/p= 1-1.2);
- 2 coppie di cromosomi **sm** sub metacentrici (q/p=1.2- 1.7);
- 2 coppie di cromosomi **a** acro centrici (q/p= >1.7).

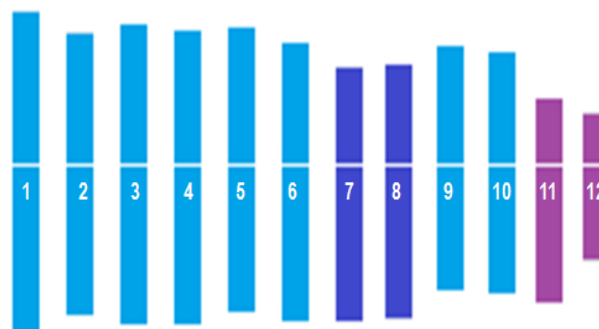


Figura 5.10. Ricostruzione dell'ideogramma dei cromosomi di *T. baccata* (n=12). I cromosomi sono numerati e classificati in tre gruppi secondo il loro rapporto bracci. Metacentrici (in azzurro); submetacentrici (in blue), acrocentrici (in viola).

5.2.5 Digestione enzimatica

Una volta convalidata l'idoneità del materiale biologico e l'efficacia del trattamento con APM sugli apici radicali, si è proceduto con successo alla loro digestione enzimatica con cellulasi e pectinasi. In seguito al trattamento enzimatico, le cellule hanno presentato una buona digestione della parete cellulare e modica presenza del citoplasma. L'apice, lavorato allo stereo microscopio, si presentava morbido e di un colore bianco-giallino. Sono stati quindi preparati vetrini metafisici di discreta qualità sui quali sono stati effettuati gli esperimenti di ibridazione *in situ* (Fig 5.11).

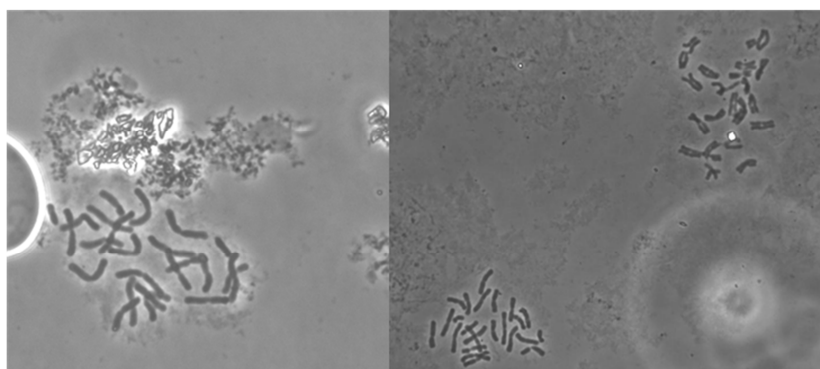


Figura 5.11. Digestione enzimatica di cromosomi in metafase mitotica presenti in cellule di apici radicali di *T. baccata*. Entrambe le immagini sono state acquisite con il microscopio ottico: a sinistra ingrandimento 100x; nell'immagine a destra (ingrandimento 80x). Si possono notare due gradi differenti di contrazione cromosomica delle cellule in mitosi presenti sullo stesso vetrino a poca distanza l'una dall'altra che ne rivelano l'elevata eterogeneità.

5.2.6 Analisi molecolari amplificazione per PCR delle sonde

I risultati relativi alle amplificazioni delle sequenze di rDNA (TbITS, Tb5S), di DNA altamente ripetuto (PABCD6, PATR140) e dei retrotrasposoni (Tb-gy, Tb-co) sono riportati di seguito nella tabella 5.3.

Tabella 5.3. Successo dell'amplificazione delle sequenze mediante PCR.

Sonda	Successo amplificazione PCR delle sequenze
TbITS	Si
Tb5S	Si
PABCD6	Si
PATR140	No
Tb-gy	No
Tb-co	No

Entrambe le sequenze di rDNA: TbITS e Tb5S, sono state amplificate nella presente ricerca con successo sul genoma di *T. baccata*.

La sequenza PABCD6 è stata amplificata con successo sul genoma di *Picea abies*. Diversamente dalla sequenza PATR140 per la quale si è constatato un insuccesso di amplificazione sia sul genoma di *T. baccata* che sul genoma di *Picea abies*.

Risultati negativi di amplificazione si sono registrati anche per le sequenze di retrotrasposoni Tb-gy e Tb-co. Difatti, nonostante le indicazioni circa i loro specifici protocolli di amplificazione disponibili on line, i differenti gradienti di temperatura di melting testati nelle PCR, e l'efficienza dell'enzimi di polimerizzazione sperimentati (§4.2.1), tali sequenze non sono state amplificate nella presente ricerca sul genoma di *T. baccata*.

5.2.7 Risultati dell'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH)

Nella seguente tabella (Tab.5.4) sono riportati i risultati delle ibridazioni *in situ* e gli eventuali *patterns* cromosomici delle sonde utilizzate:

Tabella 5.4 . Successo FISH e *patterns* cromosomici delle sonde

Sonda	Successo FISH	Pattern cromosomico
PABCD6	No	Nessuno
Tb5S	Si	Due segnali sub-centromerici non simmetrici su due bracci di un cromosoma metacentrico
TbITS	Si	Sengale centromerico, colocalizza sul cromosoma ibridato da Tb5S*
pPD5	Si	Sengale centromerico, colocalizza sul cromosoma ibridato da Tb5S*

*Segnali perfettamente coincidenti e sovrapposti.

Per quanto riguarda il gene codificante per l'RNA ribosomiale 18S, rappresentato dal clone pPD5 (18S), si è registrato un successo nell'ibridazione fluorescente *in situ*. La sonda in questione ha mostrato un *pattern* specifico sui cromosomi metafisici di *T. baccata*, localizzandosi in posizione centromerica su una coppia di cromosomi metacentrici, (Fig.5.13). L'ibridazione con Tb5S (sonda che contiene il gene codificante per rDNA 5S) genera due segnali sub-centromerici non simmetrici sui due bracci di una coppia di cromosomi omologhi metacentrici.

La sonda TbITS (comprendente il gene 5,8S e gli spaziatori interni trascritti ITS1e ITS2) e la sonda pPD5 (clone che contiene un frammento della sub unità 18S) presentano un *pattern* identico e sovrapponibile rappresentato da un segnale centromerico interno ai due segnali non simmetrici del 5S (Fig.5.13).

Tali risultati, mostrati nella figura 5.14, rivelano un *pattern* caratterizzante per la specie *T. baccata*, relativo alla colocalizzazione sullo stesso cromosoma dell' ITS, del gene 18S (sequenze interne alla sub unità 45S) e del 5S (tali risultati vengono discussi in dettaglio capitolo successivo).

Non ha generato alcun segnale invece la sonda di DNA ripetuto di 1PABCD6. Tale sonda (utilizzata da Vischi su cromosomi di abete rosso) marcata con successo nella

presente ricerca per *nick translation* utilizzando il DNA genomico di *Picea abies*, non ha mostrato alcun segnale di ibridazione sui cromosomi di *T. baccata*.

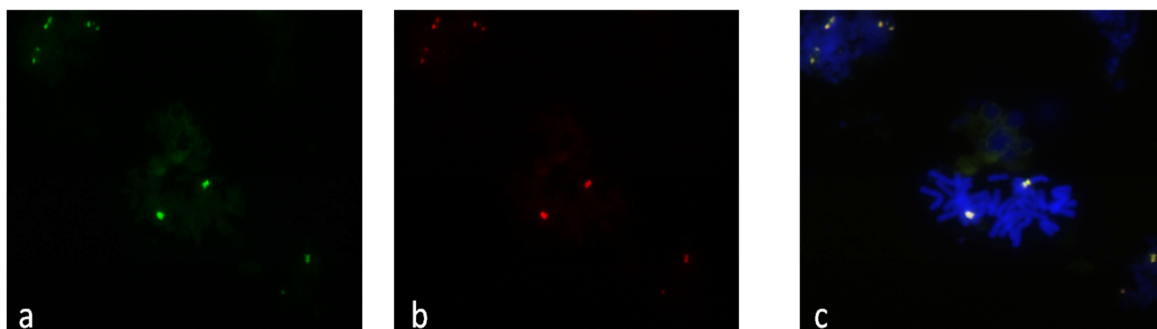


Fig.5.13. a-b-c. Applicazione della tecnica *Multicolour-FISH* a cromosomi in metafase mitotica presenti in cellule di apici radicali di talee di *T. baccata*; la sonda **TbITS – Cy3 (in rosso)** presenta un forte segnale centromerico su una coppia di cromosomi metacentrici. Tale *pattern* coincide con quello della sonda **pPD5-fitc (in verde)**, che comprende il gene codificante per l'RNA ribosomiale 18S. Le due sonde testate contemporaneamente nell'esperimento, colocalizzano esattamente sugli stessi siti della stessa coppia cromosomica come si nota nel merge delle due ibridazioni (*merge* in c). Colorazione di fondo del materiale cromatinico effettuato con DAPI. Rilevamento simultaneo dei segnali delle due sonde effettuato con doppia esposizione fotografica con filtro per CY3 (rosso) e FITC (verde). Ingrandimento 60x acquisizione con il microscopio ottico a fluorescenza Leica DM 5000.

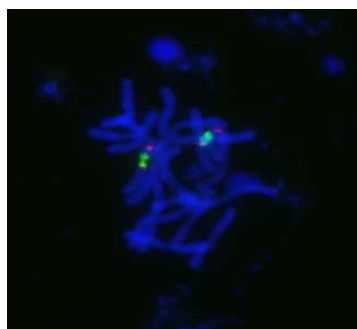


Figura 5.14. *Multicolor FISH* su cromosomi di *T. baccata*: la sonda **Tb5S – Cy3 (in rosso)** presenta due segnali sub centrometrici e non simmetrici sui due bracci di un cromosoma metacentrico; **pPD5- fitc (in verde)** presenta un forte segnale centromerico che co-localizza sullo stesso cromosoma su cui ibrida il 5S. Ingrandimento 100x microscopio a fluorescenza (colorazione di fondo effettuata con DAPI):

5.2.8 Risultati ibridazione ND-FISH con microsatelliti

La tecnica di ibridazione in condizioni non denaturanti (ND-FISH) è stata testata con successo su vetrini metafisici di *T. baccata* mediante marcatura con sonde di oligonucleotidi sintetici (SSRs) marcati con composti fluorescenti (CY3 e FITC). I risultati conseguiti nelle ibridazioni ND-FISH sono stati differenti, poiché sono strettamente dipendenti dal motivo dell' SSR testato. Il successo si è registrato infatti nel caso in cui la sequenza ripetuta di oligonucleotidi di cui era costituito il microsatellite, rappresentava una sequenza ampiamente ripetuta (affinché il segnale di ibridazione sia visibile al microscopio a fluorescenza è necessario che la sequenza sia presente in un numero di almeno in decine di migliaia di copie nel DNA target) nel genoma di *T. baccata*.

L'identificazione del *pattern* di ibridazione caratteristico per ogni SSRs sperimentato nelle *ND-FISH*, non è stato sempre possibile, in quanto questa informazione è in stretta relazione e quindi dipendente dalla qualità del preparato in termini di numero sovrapposizioni dei cromosomi metafisici. I risultati delle ibridazioni ND-FISH effettuate con gli SSRs legati a composti fluorescenti sono mostrati in tabella 5.5 e nelle figure seguenti (5.15-16-17).

Tabella 5.5. Successo FISH nell'ibridazione ND-FISH con microsatelliti su cromosomi di *T. baccata*.

SONDA	Successo ND-FISH	<i>Pattern</i> SSRs
AAC ₅ -Cy3	No	-
CAT ₅ - Cy3	No	-
AAT ₇ -Cy3	No	-
GAA-Cy3	No	-
GAA-Fitc	No	-
(TTAGGG) _n -Cy3	Si	Segnale sui telomeri di tutti i cromosomi (risultati da confermare)
AT ₁₂ - Cy3	No	-
AG ₁₂ -Cy3	Si	Segnale di ibridazione su più cromosomi, in posizione intercalare.
ACT ₅ – Fitc	No	-
5'-Fitc-GT ₁₁ -Fitc-3'	Si	Segnale centromerico su 4 coppie di cromosomi
GA ₁₀ -Cy3	Si	Segnale di ibridazione su alcuni cromosomi in posizione mediana/telomerica (risultati da confermare)

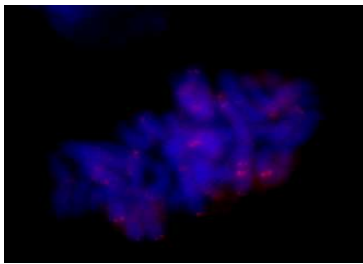


Figura 5.15. ND-FISH con la sonda telomerica **(TTAGGG)_n -Cy3** specifica per le sequenze localizzate nella parte terminale dei cromosomi ha mostrato risultati positivi restituendo segnali fuorescenti in rosso specialmente a livello dei telomeri di tutti i cromosomi di *T. baccata*. I segnali interstiziali sono da riconfermare. Acquisizione con microscopio a fluorescenza. Colorazione di fondo del materiale cromatinico effettuato con DAPI. Ingrandimento 100x.

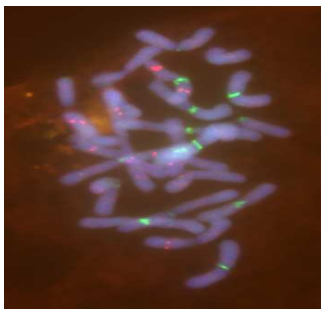


Figura 5.16. ND-FISH in doppio con una coppia di micro satelliti: la sonda **5'-fitc-GT₁₁-fitc-3' (verde)**, presenta chiari segnali centrometrici su 4 coppie di cromosomi e un segnale più fioco su un'altra coppia; **(AG)₁₂ -CY3 (in rosso)** presenta un segnale chiaro d'ibridazione ma difficilmente caratterizzabile. Colorazione di fondo del materiale cromatinico effettuato con DAPI. Rilevamento simultaneo dei segnali delle due sonde effettuato con doppia esposizione fotografica con filtro per CY3 (rosso) e FITC (verde). Microscopio a fluorescenza Ingrandimento 100x.

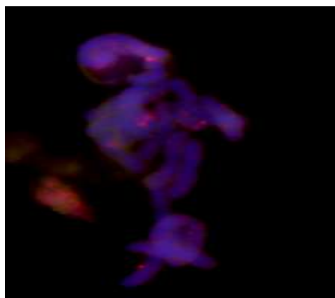


Figura 5.17. ND-FISH con **(GA)₁₀ -CY3 (in rosso)**. La sonda presenta segnali rossi, poco chiari su più cromosomi che indicano il successo dell'ibridazione della sonda, tuttavia difficilmente caratterizzabili. Colorazione di fondo del materiale cromatinico effettuato con DAPI. Rilevamento effettuato con esposizione fotografica con filtro per CY3 (rosso).

I microsatelliti AAC₅-Cy3, CAT₅- Cy3, AAT₇-Cy3, GAA-Fitc, AT₁₂- Cy3, ACT₅ – Fitc. Testati su vetrini metafisici di *T. baccata*, non hanno presentato risultati positivi nelle ibridazioni ND-FISH sperimentate.

5.2.9 Risultati delle tecniche di bandeggio cromosomico

I cromosomi di *T. baccata*, incubati con i fluorocromi DAPI e CMA, risultano negativi ad entrambe le colorazioni ed alla colorazione in simultanea CMA e DAPI (Fig.5.18).

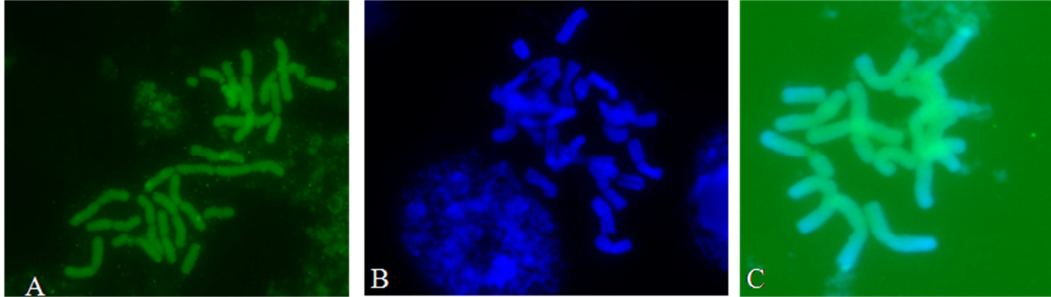


Figura. 5.18. Piastre metafasiche di *T. baccata* colorate mediante le seguenti colorazioni di bandeggio: A) cromomicina A3 ;B) Colorazione con il DAPI; C) Colorazione contemporanea con CMA3 e DAPI;

6 Discussione

Il presente progetto di ricerca si è sviluppato con l'obiettivo di approfondire questioni scientifiche dibattute circa l'ecologia e il comportamento sessuale di *Taxus baccata*, inerenti in particolare il cambiamento di sesso e l'occorrenza sporadica del monoicismo in questa specie. Tramite l'utilizzo di strumenti genetico-molecolari è stato pertanto possibile indagare aspetti interessanti quali la citogenetica e l'organizzazione fisica del genoma di *T. baccata*.

Il primo livello di analisi ha riguardato la convalida di un protocollo riproducibile per la propagazione vegetativa in tasso, basato sulla pratica del taleaggio. I risultati ottenuti confermano la possibilità di produrre materiale vivaistico in quantità ragguardevole a partire da talee legnose contenenti una porzione di ramo di un anno.

Tale tecnica, pur non fornendo un numero molto elevato di apici radicali (se si considera la percentuale totale di circa il 40% di talee radicate), ha rappresentato un presupposto fondamentale per l'acquisizione del materiale di partenza in condizioni ottimali. Si tratta di apici radicali in attiva divisione, su cui sono state effettuate le analisi citogenetiche. Il radicamento delle talee legnose è avvenuto senza l'ausilio di serre e di letti caldi, ma direttamente all'aperto tramite attrezzature normalmente presenti in qualsiasi vivaio forestale: esso ha richiesto solo l'utilizzo di una rete ombreggiante e di un impianto di irrigazione. Anche l'impiego delle soluzioni ormonali è stato di facile gestione, sia nel caso dell'applicazione dell'acido naftilacetico (NAA), sia nel caso dell'impiego dell'acido indol-3-butilirico (IBA); quest'ultimo, sebbene applicato solo al 10% delle talee legnose, si è rivelato essere in ugual modo un efficace stimolatore dello sviluppo radici avventizie in *T. baccata*.

Una considerazione importante riguarda la scelta, rivelatasi idonea, di effettuare il prelievo delle talee dalla regione basale della chioma. In tale zona infatti la pianta è fisiologicamente più giovane (in molte piante arboree esistono parti più giovanili di altre) ed il meristema apicale di un getto presenta caratteri tanto più giovanili quanto più si avvicina alla base del tronco, cioè al punto di collegamento tra fusto e radici e che spesso viene indicato come polo radicale (Bellarosa, 2003).

Tale risultato va comunque confermato con ulteriori indagini, che consentirebbero di valutare inoltre l'eventuale attitudine che i singoli alberi, maschili e femminili, possono

presentare al radicamento. Il presente lavoro di ricerca non ha evidenziato tuttavia notevoli differenze tra le percentuali di radicazione di piante dei due sessi; analogamente non è stata registrata alcuna differenza nella radicazione delle talee provenienti dai due popolamenti oggetto di studio (popolamento naturale di Carpineto Romano e individui presenti nella Villa Comunale di Ronciglione).

Relativamente alle tecniche di micropropagazione *in vitro* e propagazione vegetativa per talea degli apici caulinari è necessario precisare che, nonostante il successo ottenuto nell'applicazione dei protocolli, esse non hanno fornito materiale qualitativamente soddisfacente per effettuare adeguate prove di preparazione di cellule con cromosomi in divisione. I tessuti meristematici delle gemme “in esplosione” e delle plantule non si sono rivelati infatti tessuti idonei per tali preparazioni.

Un ulteriore aspetto di notevole interesse è costituito dai risultati raggiunti relativamente alla preparazione dei cromosomi di tasso. Essa è stata possibile tramite la messa a punto, per la prima volta, di un protocollo citogenetico standardizzato, che include informazioni inedite sulla digestione degli apici meristematici e la contrazione dei cromosomi in *Taxus baccata*.

Sono stati inoltre ottenuti risultati positivi rispetto alla visualizzazione di cellule in metafase grazie al trattamento degli apici radicali con l'amiprophos-methyl (APM). Tale erbicida, anche a basse concentrazioni, blocca la polimerizzazione dei microtubuli inibendo la formazione del fuso mitotico ed inducendo la separazione dei cromosomi metafasici (Morejohn e Fosket, 1984). Tale azione potrebbe essersi positivamente contrapposta a quella del tassolo, alcaloide presente nelle cellule di *T. baccata* (ad oggi utilizzato come farmaco chemioterapico per diversi tumori). Esso ha un effetto “iper-stabilizzante” sulla struttura dei microtubuli e produce un effetto antimitotico che è particolarmente devastante nelle cellule in rapida divisione (come le cellule tumorali).

La scelta dell'APM si è dimostrata quindi fondamentale per ottenere un elevato grado di contrazione e quindi un'ideale visualizzazione dei cromosomi di *T. baccata*. In seguito ai trattamenti con APM, i cromosomi di tasso apparivano al microscopio più condensati e meglio sparsi (= meno sovrapposti) rispetto ai trattamenti con altri agenti.

Questi risultati hanno permesso l'acquisizione di immagini di metafasi di *T. baccata*, sulle quali è stato possibile effettuare misure morfometriche puntuali che hanno condotto ad una preliminare definizione del cariotipo di tale specie. Tali esiti positivi hanno

permesso di raggiungere le condizioni ideali anche per sperimentazione della tecnica FISH per ulteriori indagini sui cromosomi di *T. baccata*.

Tramite FISH, sono stati localizzati i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5.8S-28S rDNA), i geni del complesso ribosomale minore (5S rDNA) ed individuate le sequenze telomero-specifiche, sebbene il pattern di queste ultime vada riconfermato.

Un fattore limitante nel corso degli esperimenti è stato rappresentato dal ristretto numero di sonde,rispetto alla totalità di quelle saggiate,che hanno ibridato con successo sui cromosomi di tasso, ovvero solo due sonde di rDNA con un pattern definito e chiaramente descrivibile sulle 14 testate. Tuttavia tale risultato è da considerarsi un insuccesso solo apparente. Infatti la co-localizzazione delle sonde di rDNA su un unico cromosoma di *T. baccata*, sebbene rappresenti un limite descrittivo nell'identificazione degli omologhi, fornisce informazioni interessanti che suggeriscono considerazioni di tipo evolutivo circa l'organizzazione nucleare del DNA ribosomiale di *T. baccata*.

Secondo lo studio di Wicke (2011), sono stati identificati due modelli strutturali dell'organizzazione dell'rDNA nei genomi degli eucarioti: un primo modello, noto come *S-type* –dove S sta per *separate*-(Fig.6.1–A), in cui i geni ribosomiali 5S e 45S sono separati fisicamente su cromosomi differenti (tipico della maggior parte delle piante terrestri); un secondo modello, detto *L-type*– dove L sta per *linked*), è caratterizzato invece da un'organizzazione associata delle sub unità 35S-5S rDNA che prevede una struttura sintenica sullo stesso cromosoma (Fig.6.1 –B). Il gene 5S nel modello *L-type* è incorporato infatti nello spaziatore non trascritto (*non-transcribed spacer*, NTS) della sub unità 45S.

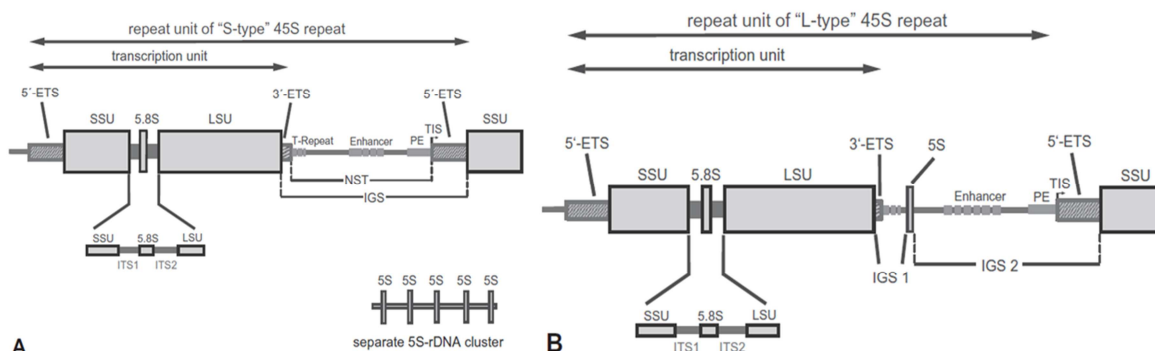


Figura. 6.1A-B. Organizzazione nucleare del DNA ribosomiale. Modello S-type (A) L-type(B).

I risultati ottenuti nella presente ricerca dalle analisi FISH mostrano per *Taxus baccata* un *pattern* di co-localizzazione sullo stesso cromosoma dell'ITS e del gene 18S, sequenze entrambe interne alla sub unità 45S e del 5S. Pertanto, secondo la distinzione di Wicke, il

tasso in questo modo verrebbe classificato tra gli eucarioti appartenenti al cluster *L-type* caratterizzati da un modello a tandem delle sub unità 45S e 5S (Figura XX-b).

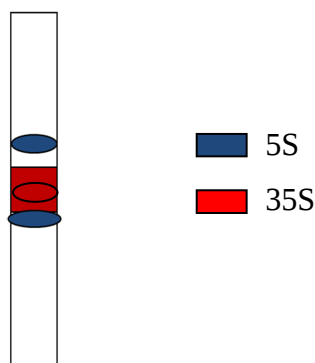


Figura 6.2. Organizzazione dell'rDNA in *T. baccata*.

Si ipotizza che tale organizzazione sia specifica di uno stadio ancestrale tipico degli organismi più antichi del regno vegetale; essa è stata osservata infatti anche nelle alghe streptofite e piante terrestri, come le epatiche, in molte briofite, lycopodi e nelle felci.

Gli studi citogenetici effettuati nelle Gimnosperme e prevalentemente nelle *Pinaceae* (Pinophyta), hanno mostrato tuttavia un'organizzazione variabile dei geni 5S e 45S. All'interno di questa famiglia infatti esistono non poche differenze nell'organizzazione delle sub unità di rDNA anche intra-genere; i *patterns* dell'rDNA variano in funzione della specie, del genere e delle condizioni di stringenza delle ibridazioni effettuate (Islam Faridi, 2011).

Comunque sono in corso nella comunità scientifica studi più approfonditi sul riarrangiamento delle sub unità ribosomiali delle Gimnosperme forestali, come quello di Garcia e Kovar (2013), in cui sono stati effettuati esperimenti di *Southern Blot* per determinare l'organizzazione del 5S e 45S. Nel lavoro appena citato, anche la specie *Taxus baccata* è stata oggetto delle ibridazioni *Southern*, che suggeriscono una classificazione nel cluster *S-type*. Tuttavia la discordanza tra questo dato e i risultati di questa ricerca (che classificano il tasso nel cluster L), non rappresenta un problema. Infatti gli esiti degli esperimenti di *Southern* presentati ed interpretati da Garcia e Kovar, per essere validati necessitano di essere confermati o meno da esperimenti di FISH, tecnica che fotografa senza margine d'errore la reale organizzazione fisica delle sonde testate sul genoma in questione. Allo stesso tempo ulteriori studi su vasta scala potrebbero anche evidenziare una variabilità intra-generica come quella già dimostrata in *Pinus* (Islam Faridi, 2011).

Un'indagine più approfondita dovrà essere riservata inoltre allo studio del *pattern* delle sequenze microsatelliti (GA₁₀, AG₁₂, GT₁₁) che in questa ricerca hanno mostrato un segnale negli esperimenti di ND-FISH sui cromosomi metafasici di *T. baccata*. Risulta infatti difficile al momento descrivere la loro precisa distribuzione sui cromosomi di tasso a causa di un numero troppo esiguo di preparati cromosomici e di cellule di buona qualità disponibili. Ciò nonostante la ND-FISH testata su questa specie con SSRs ha senza dubbio aperto, a partire da questa indagine, uno scenario fino ad ora inesplorato. Ulteriori ibridazioni con microsatelliti sui cromosomi di tasso sono attesi portare ad interessanti risultati e importanti considerazioni.

Dalla sintesi delle informazioni ottenute dalle FISH e dalle analisi morfometriche è stato possibile costruire, in via preliminare, un ideogramma dei cromosomi di *T. baccata* rappresentato da un corredo aploide di 12 cromosomi, con 8 coppie di cromosomi metacentrici, 2 coppie di cromosomi sub metacentrici e 2 coppie di cromosomi acrocentrici. I segnali delle sub unità ribosomiali 5S e 45S co-localizzano su un cromosoma metacentrico, con una organizzazione caratteristica descritta nei Risultati e riportata nella ricostruzione dell'ideogramma di *T. baccata* che segue in fig.6.3.

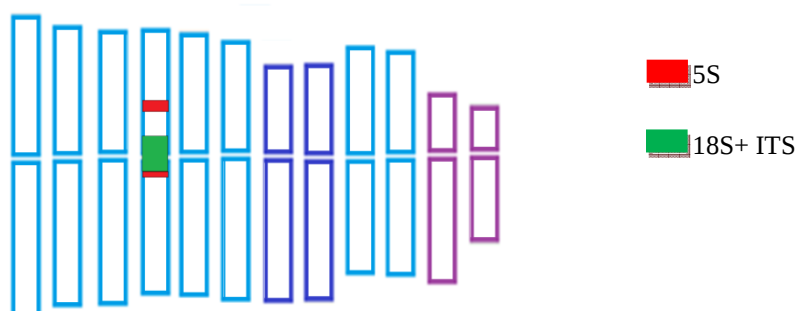


Figura. 6.3. Ideogramma di *Taxus baccata*: la sonda 5S (Tb5S) in rosso presenta due segnali sub centrometrici e non simmetrici sui due bracci di un cromosoma metacentrico; le due regioni 18S (pPD5) e ITS (TbITS), in verde, presentano un segnale forte e coincidente, centromerico che colocalizza sullo stesso cromosoma su cui ibrida il 5S.

Le informazioni sul cariotipo di *Taxus baccata* ottenute in questa ricerca vanno a completare ed aggiornare gli studi citologici del 1932 di Dark, ad oggi l'unico riferimento bibliografico per questa specie.

Infine, in merito all'obiettivo di identificare eventuali cromosomi sessuali in *Taxus baccata*, in seguito ad un'indagine preliminare sulle metafasi di individui maschi e femmine, non si sono notate evidenti differenze morfologiche tra i cromosomi dei due sessi. Ciò però potrebbe voler dire, avanzando un'ipotesi al momento forse ancora prematura data la scarsità di prove sperimentali, che in *Taxus baccata* i cromosomi sessuali, qualora presenti, sarebbero omomorfici, ovvero non mostrano differenze morfologiche. In questo caso i sessi distinti nella specie dioica di *T.baccata*, potrebbero essere conseguenza di una determinazione genetica, dipendente da regioni geniche *sex-linked* strettamente legate alla determinazione sessuale. Così come sintetizza Ming (2011), nelle specie dioiche che non presentano eteromorfismo nei cromosomi sessuali, sarebbero tali geni i responsabili della determinazione del sesso. Inoltre lo stesso autore, come riportato già nell'introduzione, sostiene che nelle specie dioiche caratterizzate da cromosomi sessuali nelle prime fasi dell'evoluzione (prima della letalità del genotipo YY o WW), possono verificarsi delle inversioni delle condizioni sessuali -come l'inversione sessuale o il ripristino del monoicismo o dell' eteromorfismo- se tali condizioni risultano essere strategicamente vantaggiose per l'ambiente, per la popolazione e per assicurare la sopravvivenza della specie.

Quest'ultima ipotesi potrebbe valere da supporto per la spiegazione dei fenomeni registrati nel caso studio di Carpineto Romano (tasseta in cui si sono osservati alcuni individui monoici e si è registrata un'inversione sessuale variabile da un anno all'altro, per il 60% delle piante oggetto del monitoraggio pluriennale).

Una più approfondita chiave di lettura per la comprensione di questi eventi può essere ricercata nel quadro più generale che Freeman *et al.* (1980) hanno delineato mediante una sintesi dei risultati degli studi e delle segnalazioni raccolte dalla bibliografia. In tale ambito è emerso come la variazione dell'espressione del sesso (notata anche per molte specie erbacee, arbustive ed arboree) sia fortemente influenzata da fattori ambientali, che possono determinarla anche in caso di specie dotate di cromosomi sessuali e addirittura eteromorfi. Come caso generale è emerso che condizioni più proprie dell'ambiente di crescita delle piante (disponibilità in acqua, temperatura, anidride carbonica, luminosità, concimazione letamica, azoto) portano ad esaltare la funzione femminile, probabilmente attraverso l'incidenza su fitormoni che orientano la funzione sessuale verso uno dei due sessi. In analogia a quanto riportato da Allison per il *Taxus canadensis*, gli stessi autori riportano casi di singole piante che da giovani erano maschili e più in avanti femminili. Anche

questa evidenza può essere messa in relazione alla capacità di riserva, per il maggiore dispendio di energie, che la produzione di fiori femminili richiede. Secondo inoltre le considerazioni di Salis (2012) sarebbero le piante femmine di tasso, maggiormente sottoposte a stress (fatto evidenziato da minori risposte in altezza alla competizione), ad essere totipotenti, quindi capaci, indeterminate condizioni ambientali, di effettuare *sex-shifting*, ovvero inversione sessuale da femmina a maschio. Uno dei fattori determinanti il cambiamento è rappresentato dalla luce; diversamente, ossia nel caso in cui la risposta al cambiamento ambientale non sia sufficientemente rapida, la pianta soccombe (modello ESD -*Environmental Sex Determination*).

Trova fondamento comunque l'ipotesi che le motivazioni dell'inversione sessuale siano addebitabili alla disponibilità energetica. Inoltre gli autori pongono, a ragione, l'accento sulle implicazioni di una variabilità sia temporale (da un anno all'altro) sia spaziale (micrositi in cui possono trovarsi a vivere gli individui di una popolazione), in relazione alla possibilità che specie dioiche possano determinare il sesso della generazione futura, predisponendo quello più idoneo alle caratteristiche intrinseche o direzionandolo verso una moecità.

7 Conclusioni e prospettive

In conclusione i risultati conseguiti in questo progetto di ricerca rappresentano presupposti oggettivamente interessanti per proseguire le indagini, al fine di convalidare il cariotipo di *Taxus baccata* e avviare ulteriori sperimentazioni, volte alla ricerca dei cromosomi sessuali o regioni *sex-linked* in questa specie.

In quest'ottica si delineano gli sviluppi futuri della presente ricerca che schematicamente prevedono:

1. L'ottimizzazione delle tecniche di propagazione vegetativa (radicale o caulinare), al fine di ottenere un'elevata percentuale di materiale meristematico per le analisi citogenetiche.
2. L'utilizzo di nuovo materiale biologico, rappresentato da semi spontaneamente germinati di *Taxus baccata*.
3. Il miglioramento dei preparati metafasici degli apici digeriti e fissati su vetrini, da utilizzare per l'ibridazione *in situ*. Un miglior preparato dovrebbe presentare cromosomi maggiormente condensati e meno sovrapposti per favorire l'identificazione dei *patterns* di distribuzione cromosomica delle sequenze usate come sonde.
4. L'utilizzo di nuove sonde, oligonucleotidi sintetici e sequenze di DNA altamente ripetuto, da saggiare con la tecnica della FISH (sarebbe auspicabile utilizzare sequenze provenienti dal genoma di tasso sequenziato, progetto ad oggi in corso, al fine di poter localizzare direttamente e fisicamente geni d'importanza o marcatori a loro associati). I *patterns* delle nuove sonde, unitamente alle misure morfologiche, conferirebbero una validazione e caratterizzazione ottimale dei cromosomi di *Taxus baccata*.
5. La ricerca di metafasi, provenienti da individui di sessi diversi, al fine di sottolineare le eventuali differenze nei rispettivi assetti cromosomici. Il raggiungimento finale di questo obiettivo potrebbe infatti far luce, non solo sulla citogenetica del tasso, ma anche fornire spunti interessanti sulle sue strategie sessuali.

6. Lo studio della metilazione del DNA sui cromosomi sessuali che, da quanto si è osservato negli ultimi anni, è un fenomeno determinante l'espressione sessuale nelle piante; tuttavia il suo meccanismo molecolare è ancora sconosciuto. L'inversione sessuale infatti, influenzata da fattori ambientali, potrebbe ulteriormente essere esplorata tramite studi epigenetici.

8 Bibliografia

- Abbasian Z., Zamani S., Movahedi S., Khaksar G. and Sayed Tabatabaei BE. (2010). *In vitro* micropropagation of yew (*Taxus baccata*) and production of plantlets. *Biotechnology*. 9(1): 48-54.
- Abraham A., Mathew P. (1962). Cytological studies in the Cycads: sex chromosomes in *Cycas*. *Annals of Botany*. 26:261-66.
- Ahuja M. (2001). Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173-195.
- Ahuja M., Neale D. (2002). Origins of polyploidy in coast redwood (*Sequoia sempervirens* (d. Don) Endl.) and relationship of coast redwood to other genera of Taxodiaceae. *Silvae Genetica*. 51: 93-100.
- Ahuja M. (2005). Polyploidy in gymnosperms: Revisited. *Silvae Genetica*. 54: 59-69.
- Ahmadi H., Bringhurst R. (1991). Genetics of sex expression in *Fragaria* species. *American Journal of Botany*. 78:504-514.
- Allison T. D. (1990a). The influence of deer browsing on the reproductive biology of Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.). I. Direct effect on pollen, ovule, and seed production. *Oecologia* 83: 523-529.
- Allison T.D. (1991). Variation in sex expression in Canada Yew (*Taxus canadensis*). *American Journal of Botany*. 78(4): 569-578.
- Amarasinghe V. & Carlson J.E. (1998). Physical mapping and characterization of 5S rRNA genes in Douglas-fir. *Journal of Heredity*. 89: 495-500.
- Anamthawat-Jónsson K. (2003). Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. *Methods in Cell Science*. 25: 91-95.
- Anamthawat-Jónsson K., Thórsson A.T. (2003). Natural hybridization in birch: Triploid hybrids between *Betula nana* and *B. pubescens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 75: 99-107.
- Barcaccia G. & Lucchin M. & Parrini P. (2000). Analisi del genoma mediante marcatori molecolari. II: Principali applicazioni. *Riv. Sementi Elette*. 5, 17-34.
- Barcaccia G., Meneghetti S., Albertini E., Triest L., Lucchin M. (2003): Linkage mapping in tetraploid willows: Segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure for *Salix alba* x *Salix fragilis* interspecific hybrids. *Heredity*. 90: 169-180.
- Barral G., Poggio L., Giberti G. (1995). Chromosome numbers and DNA content from *Ilex argentina* (Aquifoliaceae). *The Bulletin of the Botanical Society of Argentina*. 30: 243-248.
- Barreneche T., Casasoli M., Russell K., Akkak A., Meddour H., et al. (2004). Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 558-566.

- Bell C.F., C.J., Ecker J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*. 19: 137-144.
- Bellarosa R., Delre V., Schirone B., Maggini F. (1990). Ribosomal RNA genes in *Quercus* spp. (Fagaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 172: 127–139.
- Bellarosa R. (2003). La Propagazione vegetativa del tasso (*Taxus baccata* L.). In: Il Tasso un albero da conoscere e conservare (B. Schirone, R. Bellarosa, G. Piovesan, eds.). 114-142, ISBN/ISSN: 88-85312-50-0.
- Beech R., Strobeck C. (1993). Structure of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene family of white spruce (*Picea glauca*). *Plant Molecular Biology*. 22: 887–892.
- Bennett P. (2000). Microsatellites. *Molecular Pathologies*. 53(4):177-183.
- Bennett M., Leitch I. (2004). Angiosperm DNA c-values database (release 5.0, dec. 2004) [http:// www.kew.org/cval/homepage.html](http://www.kew.org/cval/homepage.html).
- Bennett M., Smith J., Heslop-Harrison J. (1982). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 216: 179–199.
- Bensen R.J., Johal G.S., Crane V.C., Tossberg J.T., Schnable P.S., *et al.* (1995). Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *Plant Cell*. 7: 75–84.
- Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M. (2006). *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. 6: 45-52.
- Berg D.E., Howe M.M., (1989). Mobile DNA. Washington, USA. *American Society for Microbiology*. 972.
- Blakesley D., Allen A., Pellny T., Roberts A. (2002). Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. *Annals of Botany*. 90: 391–398.
- Blocka-Wandas M., Sliwinska E., Grabowska-Joachimciak A., Musial K, Joachimciak JA. (2007). Male gametophyte development and two different DNA classes of pollen grains in *Rumex acetosa* L., a plant with an XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and a female-biased sex ratio. *Sexual Plant Reproduction*. 20: 171–80.
- Bobola M., Smith D., Klien A. (1992). Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 125–137.
- Bogunic F., Siljak-Yakovlev S., Muratovic E. & Ballian D. (2011). Different karyotype patterns among allopatric *Pinus nigra* (Pinaceae) populations revealed by molecular cytogenetics. *Plant Biology*. 13: 194-200.
- Bolsinger C.L. and Jaramillo A.E. (1990). *Taxus brevifolia* Nutt., Pacific Yew. In: R.M. Burns, and B.H. Honkala, eds. *Silvics of North America. Agriculture Handbook 654. Forest Service*, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. P. 573-579.
- Bolsinger C. L., Jaramillo A. E. (2001). Pacific Yew.

- Brown GR. & Carlson JE. (1997). Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-26S rRNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 1-9.
- Brown G., Newton C., Carlson J. (1998). Organization and distribution of Sau3a tandem repeated DNA sequence in *Picea* (Pinaceae) species. *Genome*. 41: 560–565.
- Brzeziecki B. & Kienast F. (1994). Classifying the life-history strategies of trees on the basis of the Grimian model. *Ecology and Management*. 69: 167-187.
- Cai Q., Zhang D., Liu Z.-l., Wang X.-R. (2006). Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobos* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany*. 97: 715– 722.
- Caperta AD., Neves N., Morais-Cecílio L., Malhó R., Viegas W. (2002). Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science*. 115: 2839– 2846.
- Carvalho A. B., Koerich L. B. and Clark A. G. (2009). Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends in Genetics*. 25 270–277.
- Castilho A., Heslop-Harrison J. (1995). Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata* . *Genome*. 38: 91–96.
- Cattivelli L., Baldi P., Crosatti C., Di Fonzo N., Faccioli P., Grossi M., Mastrangelo A.M., Pecchioni N., Stanca A.M. (2002). *Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae*. *Plant Molecular Biology*. 48: 649–665.
- Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Marè C., Tondelli A., Stanca A.M. (2007). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrate view from breeding to genomics. *Field Crops Research*. 105:1-14.
- Chang S.-H., Ho C.-K. & Tsay J.-Y. (1998). Micropropagation of *Taxus mairei* seedlings at different ages and recoverability of their plagiotropic shoots. *Taiwan Journal of Forest Science*. 13:29–39.
- Chang, S.H., C.K. Ho, Z.Z. Chen and J.Y. Tsay, (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*. 20: 496-502.
- Charlesworth D. (1985). Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In *Evolution— Essays in Honour of John Maynard Smith*, ed. PJ Greenwood, M Slatkin. 237–68. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Charlesworth, B (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*. 6: 149.
- Charlesworth D., Guttman D.S. (1999). The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems, in Ainsworth CC (ed): *Sex Determination in Plants*, (BIOS Scientific Publishers, Oxford) : 25–49.

- Charlesworth D. Plant sex chromosome evolution. (2012). *Journal Experimental Botany*. Jan; 64(2):405-20.
- Chee P.P. (1995). Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. *Plant Cell Reports*. 14: 560–565.
- Chen RY., Song WQ., Li XL. (1987). Study on the sex chromosomes of *Ginkgo biloba*. Proc. Sino-Jpn. Symp. *Plant Chromosome Research*. 381–86.
- Cheng Y., Chaw S., R. Nicholson and K. Tripp. (2000). Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast matK gene and nuclear rDNA ITS region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14(3): 353-365.
- Clausen K., Kung F., Bey C., Daniels R.A. (1982). Variation in white ash. *Silvae Genetica*. 30: 93–97.
- Cope E. A. (1998). Taxaceae: the genera and cultivated species. *Botanical Review*. 64: 291-323.
- Croom E.M. (1995) *Taxus* for taxol and taxoids. In Suffness, M. (Ed.) *Taxol – Science and Application*. CRC Press, Inc. 37–70.
- Cuadrado N., Jouve N. (2010). Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma*. 19:495-503.
- Cuadrado A., Vitellozzi F., Jouve N. & C. Ceoloni. (1997). Fluorescence in situ hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat/rye chromosome pairing. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 347-355.
- Cullis C.A., Creisson G.P., Gorman S.W. & Teasdale R.D. (1988). The 25S, 18S and 5S ribosomal RNA genes from *Pinus radiata* D.Don. Proceedings of the 2nd IUFRO WP on Molecular genetics of forest trees. Canadian Forest Service, Petawawa National Forest Institute 33-40.
- Cuñado N., Navajas-Perez R., de la Herran R., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M., et al. (2007). The evolution of sex chromosomes in the genus *Rumex* (Polygonaceae): identification of a new species with heteromorphic sex chromosomes. *Chromosome Research*. 15:825–33.
- Dark, S. O. S. (1932). Chromosomes of *Taxus*, *Sequoia*, *Cryptomeria* and *Thuja*. *Annals of Botany* 46: 965-977.
- Debazac E. (1964). Manuel des coniferes. *Ecole National des Eaux et Forets*. Nancy, France.
- de Bustos A., Cuadrado A., Soler C., Jouve N. (1996). Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Research* (4): 491–499.
- DeLong A., Calderon-Urrea A., Dellaporta S.L. (1993). Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell*. 74: 757–768.

- Devey M., Sewell M., Uren T., Neale D. (1999). Comparative mapping in loblolly pine and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 656–662.
- Di Cosmo. (2002). Il problema dei boschi da seme in Italia: Aspetti scientifici, legislativi e gestionali, tesi di dottorato. Corso di dottorato in Assestamento forestale - XVI Ciclo. Discussa nell'a.a 2001/2002. rel B. Schirone.
- D'Ovidio R., Scarascia Mugnozza G. and Tanzarella O.A. (1991) rDNA cloning and rapid hybrid identification in *Populus* spp. (Salicaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 177:165-174.
- D'Ovidio R., (1992). Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides*. *Plant Molecular Biology*. 19: 1069–1072.
- Doudrick R., Heslop-Harrison J., Nelson C., Schmidt T., Nance W., Schwarzacher T. (1995). Karyotype of slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) using patterns of fluorescence *in situ* hybridization and fluorochrome banding. *Journal of Heredity*. 86: 289– 296.
- Dubey K.P. (1997). Himalayan yew (*Taxus baccata*) conservation: a vegetative approach. *Indian Forester*. 123 (12): 1150-1154.
- Eccher T. (1988). Response of cuttings of 16 *Taxus* cultivars to rooting treatments. *Acta Horticulturae*. 227: 251-253.
- Ewald D., Stauber T. & Zocher R. (2002). Evaluation and selection of *Taxus baccata* L. clones according to their root growth capacity as a potential source of enzymes for taxol biosynthesis. *Silvae Genetica*. 4: 133–136.
- Falconer Marcia M., and Seagull R.W. (1987). “Amiprophos-methyl (APM): A Rapid, Reversible, Anti-microtubule Agent for Plant Cell Cultures,” *Protoplasma*. (136): 118-124.
- Flavell A.J., Smith D.B., Kumar, A. (1992). Extreme heterogeneity of *Ty1-copia* group retrotransposons in plants. *Molecular and General Genetics* MGG. Springer Berlin/Heidelberg.
- Florin R. (1948). On the morphology and relationships of the Taxaceae. *Botanical Gazette*. 110: 31–39.
- Foss M., Wilcox B.W.L., Alsop G.B., Zhang D. (2008). Taxol Crystals Can Masquerade as Stabilized Microtubules. *PLoS ONE*. 3(1): e1476.
- Freeman D. C., Harper K. T., and Chamov E. L. (1980). Sex change in plants: old and new observations and new hypotheses. *Oecologia*. (Berlin) 47: 222-232.
- Freeman D.C., Doust J.L., El-Keblawy A., Miglia K.J., McArthur E.D. (1997). Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. *The Botanical Review*. 63: 65-92.
- Friesen N., Brandes A., Heslop-Harrison J.S. (2001). Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (*gypsy* and *copia*) in conifers. *Molecular Biology and Evolution*. 18(7): 1176-1188.

- Fuchs J, Brandes A, Schubert I (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Systematics and Evolution*. 196: 227–241.
- Gall J. G., and M. L. Pardue (1969). The formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.* 63: 378-383.
- Garcia S., Garnatje T. & Kovarik A. (2011). Plant rDNA Database (release 1.0.2011: <http://www.plantrdnadatabase.com>). Database environment by Gálvez F.
- Garcia D., Zamora R., Hodar J. A., Gómez J. M., Castro J. (2000). Yew (*Taxus baccata* L.) regeneration is facilitated by fleshy-fruited shrubs in Mediterranean environments. *Biological conservation*. 95: 31-38.
- Gellini R., Grossoni P. (1996). *Botanica Forestale*. Ed. Cedam, Padova. (I): 15-20.
- Gentilomi G. (1990). Sonde genetica in microbiologia. 66, Caleidoscopio. *Medical System S.P.A.* 1-71.
- Giertych P. (2000). Factor determining natural regeneration of yew (*Taxus baccata* L.) in the Kòrník Arboretum. *Dendrobiology*. 45: 31-40.
- Girotti S., Ferri, E., Ghini S., Fini F., Musiani M., Zerbini M., Gibellini D., Gentilomi G. (1991). Direct quantitative chemiluminescent assays for the detection of viral DNA. *Analytica Chimica Acta*. 255: 387-394.
- Goldberg M.T., Spigler R.B., Ashman T.L. (2010). Comparative genetic mapping points to different sex chromosomes in sibling species of wild strawberry (*Fragaria*). *Genetics*. 186: 1425-1433.
- Gordienko F. Sapzhnikova N.F. (1974). Rooting of same species of conifers in relation to their physiological activity. *Ucrains 'kii Botanichnii Zhurnal*. 31:618-623.
- Grabowska-Joachimiak A., Sliwiska E., Pigula M., Skomra U., Joachimiak A.J. (2006). Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold & Zucc. (Cannabaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 75:207–14.
- Greilhuber J. (1988). Critical reassessment of DNA content in plants in Kew Chromosome Conference III (Brandham PE, ed.). 39-50, London: HMSO.
- Guesdon J.-L. (1992). Immunoenzymatic techniques applied to the specific detection of nucleic acids. A review. *Journal of Immunological Methods*. 150: 33-49.
- Hageneder F. (2007). Yew – A History. Stroud, Sutton Publishing.
- Hair J. (1968). The chromosomes of the Cupressaceae. *New Zealand Journal of Botany*. 6: 277–284.
- Hartman H.T. Kester D. E. (1965). Propagazione delle piante basi scientifiche e applicazioni tecniche. *Edagricole*. Bologna.
- Harvey C. F., Fraser L. G., and Gill G. P. (1997). Sex determination in *Actinidia*. *Acta Horticulturae*, 444: 85-88.

- Hizume M., Shiraishi H., Tanaka A. (1988). A cytological study of *Podocarpus macrophyllus* with special reference to sex chromosomes. *Japanese Journal of Genetics*. 63:413–23.
- Hizume M. & Akiyama M. (1992). Size variation of chromomycin A3-band in chromosomes of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Japanese Journal of Genetics*. 67: 425-435.
- Hizume M., Shibata F., Matsusaki Y. & Kondo T. (1999). Mapping of 45S rRNA and 5S rRNA loci in *Cryptomeria japonica*, *Cunninghamia lanceolata* and *Ginkgo biloba*. *Chromosome Science*. 3: 142.
- Hizume M., Shibata F., Matsusaki Y., Kondo T. (2000). Chromosomal localization of telomere sequence repeats in five gymnosperm species. *Chromosome Science*. 4: 39–42.
- Hizume M., Shibata F., Maruyama Y., Kondo T. (2001). Cloning of DNA sequences localized on proximal fluorescent chromosome bands by microdissection in *Pinus densiflora* Sieb. & Zucc. *Chromosoma*. 110: 345–351.
- Hizume M., Shibata F., Matsusaki Y., Garajova Z. (2002). Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 105: 491–497.
- Hulme P. E. (1996). Natural regeneration of yew (*Taxus baccata* L.): microsite, seed or herbivore limitation?. *Journal of Ecology*. 84: 853-861.
- Islam-Faridi M., Nelson C., Kubisiak T. (2007). Reference karyotype and cytomolecular map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Genome*. 50: 241–251.
- Islam - Faridi M.N and Nelson CD.(2011). “Cytogenetics”. In Genetics, Genomics and Breeding of Conifers edited by C. Plomion, J. Bousquet & C. Kole. CRC Press, Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire. 128-140.
- Jacobs M., Gardner R., Murray B. (2000). Cytological characterization of heterochromatin and rDNA in *Pinus radiata* and *P. taeda*. *Plant Systematics and Evolution*. 223: 71–79.
- Jiang J., Gill B. (2006). Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*. 49: 1057–1068.
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. Aug 9(223):582–587.
- Kamm A., Doudrick R., Heslop-Harrison J., Schmidt T. (1996). The genomic and physical organization of tyl-copia-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliottii* var. *elliottii* and other gymnosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 93: 2708–2713.
- Karlov GI, Danilova TV, Horlemann C, Weber G. (2003). Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica* 132:185–90.
- Karvonen P., Karjalainen M., Savolainen O. (1993). Ribosomal RNA genes in scots pine (*Pinus sylvestris* L.): Chromosomal organization and structure. *Genetica*. 88: 59–68.

- Kato Seiji, Ohmido Nobuko, Hara Masaki, Kataoka Ryouhei, Fukui Kiichi (2010). Regular Article Image analysis of small plant chromosomes by using an improved system , CHIAS IV. 43-50. In *Image (Rochester, N.Y.)*.
- Keen R., Chadwich L.C. (1954). Warn propagators to watch for sex reversal in *Taxus*. *American Nurseryman*.
- Khoshoo, T.N. (1961). Chromosome numbers in gymnosperms. *Silvae Genetica*. 10: 1–9.
- Klug W. S. and Cummings M. R. (2000). Concepts of Genetics. 6th ed. New Jersey, Prentice-Hall.
- Kondo M., Nanda I., Hornung U., Schmid M. and Scharl M. (2004). Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Current Biology*. 14: 1664–1669.
- Kumar A., Pearce S.R., McLean K., Harrison G., Heslop-Harrison J.S., Waugh R., Flavell A.J. (1997). The *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica*. 100: 205-17.
- Lahn B. T., Page D. C. (1999a). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*. 278:675-680.
- Lan T., Chen R.Y., Li X.L., Dong F.P., Qi Y.C., Song W.Q. (2008). Microdissection and painting of the W chromosome in *Ginkgo biloba* showed different labelling patterns. *Botanical Studies*. 49: 33–37.
- Lee C.L. (1954). Sex chromosomes in *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany*. 41: 545–49.
- Leuthold C. (1998). Die pflanzensoziologische und ökologische Stellung der Eibe (*Taxus baccata* L.) in der Schweiz—ein Beitrag zur Wesenscharakterisierung des “Ur-Baumes” Europas. *Schweiz Z Forstwes*. 49: 349–371.
- Lloyd G. and McCown B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society*. 30: 421-427.
- Lim K., Matyášek R., Lichtenstein C., Leitch A. (2000). Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section Tomentosae. *Chromosoma*. 109: 245–258.
- Liu Z.L., Zhang D., Hong D.Y. & Wang X.R. (2003). Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian pines using fluorescence *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 198-204.
- Liu B., Zhang S.G., Zhang Y., Lan T.Y., Qu L.W. & Song W.Q. (2006). Molecular cytogenetic analysis of four *Larix* species by bicolor fluorescence *in situ* hybridization and DAPI banding. *International Journal of Plant Sciences*. 167: 367-372.
- Long E.O., David I.D. (1980):Repeated genes in eukariotes. *Annual Review of Biochemistry*. 49:727-764.

- Lubaretz O., Fuchs J., Ahne R., Meister A. & Schubert I. (1996). Karyotyping of three Pinaceae species via fluorescent *in situ* hybridization and computer-aided chromosome analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 411-416.
- Majada J.P., Sierra, M.I. & Sanchez-Tames, R. (2000). One step more towards taxane production through enhanced *Taxus* propagation. *Plant Cell Reports*. 19: 825–830.
- MacPherson P., Filion W. (1981). Karyotype analysis and the distribution of constitutive heterochromatin in five species of pinus. *Journal of Heredity*. 72: 193–198.
- Metaxas D., Syros T., Yupsanis T. and Economou A. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation*. 44: 257-266.
- Ming R., Moore P.H. (2007). Genomics of sex chromosomes. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 123–130.
- Ming R., Bendahmane A., Renner S. (2011). Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 485–514.
- Mitter H. and Sharma A. (1999). Propagation of *Taxus baccata* Linn. By stem cuttings. *Indian Forester*. 159-162.
- Morais-Cecílio L., Delgado M., Jones R., Viegas W. (1996). Painting rye B chromosomes in wheat: Interphase chromatin organization, nucleolar disposition and association in plants with two, three or four Bs. *Chromosome Research*. 4: 195–200.
- Morejohn L.C., Fosket D.E. (1984b). Inhibition of plant microtubule polymerization *in vitro* by the phosphoric amide herbicide amiprofos-methyl. *Science*. 224: 874-876.
- Morgante M., Olivieri A.M. (1993). PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*. 3:175-182.
- Mukunda D. B., Srivastava S., Kushwaha S. P. S., Roy P. S. (2000). Stratification and mapping of *Taxus baccata* L. bearing forests in Talle Valley using remote sensing and GIS. *Current Science*. (78) 8: 1008-1013.
- Murashige & Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. 15: 473-49.
- Murray B., Leitch I., Bennett M. (2004). Gymnosperm DNA c-values database (release 3.0, dec. 2004).(<http://www.kew.org/cval/homepage.html>).
- Murray B., Friesen N. & Heslop Harrison J. (2002). Molecular cytogenetic analysis of *Podocarpus* and comparison with other Gymnosperm species – *Annals of Botany*. 89: 483-489.
- Nagano K., Matoba H., Yonemura K., Matsuda Y., Murata T. & Hoshi Y. (2007). Karyotype analysis of three *Juniperus* species using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with two ribosomal RNA genes. *Cytologia*. 72: 37-42.
- Nakao Y., Taira T., Horiuchi S., Kawase K. & Mukai Y. (2005). Chromosomal difference between male and female trees of *Ginkgo biloba* examined by karyotype analysis and mapping

of the rDNA on the chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Sciences*. 74: 275-280.

Namvar von K. Sperthman W. (1986). Die Eibe (*Taxus baccata* L.). Allgemeine Forstzeitschrift. 41(23): 568-571.

Nandi S.K., Palni L.S.M. Rikhari H.C. (1996). Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* rootings. *Plant Growth Regulation*. 19: 117-122.

Nasr Hoseini S.M., Modanloo S., Jalilvand H. and Mofidabadi A.J. (2007). Seed dormancy breakage of recalcitrant Yew species (*Taxus baccata* L.) using embryo culture. *Journal of Biological Sciences*. 7: 781-785.

Navajas-Perez R., de la Herran R., Lopez Gonzalez G., Jamilena M., Lozano R., *et al.* (2005). The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (Polygonaceae) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1929–39.

Newcomer E.H. (1954). The karyotype and possible sex chromosomes of *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany*. 41: 542– 45.

Nicolas M., Marais G., Hykelova V., Janousek B., Laporte V., *et al.* (2005). A gradual process of recombination restriction in the evolutionary history of the sex chromosomes in dioecious plants. *PLOS Biology*. 3(1): 47-56.

Nicolaou K.C. *et al.* (1993). "Design, Synthesis and Biological Activity of Protaxols". *Nature*. (364) No. 6436, Jul. 29, 1993.464-466.

Ohri D., Ahuja M. (1991). Giemsa C-banding in *Fagus sylvatica* L., *Betula pendula* Roth and *Populus tremula* L. *Silvae Genetica*. 40: 72–75.

Ottaggio, L., Bestoso F., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Mazzei M., Sancandi M., Miele M. (2008). "Taxanes from Shells and Leaves of *Corylus avellana*". *Journal of Natural Products*. 71(1): 58–60.

Paule L., Gomory D., Longauer R. (1993). Present distribution and ecological conditions of the English yew (*Taxus baccata* L.) in Europe. *Paper for the International Yew Resources Conference*. Berkley, CA, March. 12-13.

Pearce S.R., Harrison G., Li D., Heslop-Harrison J.S., Kumar A., Flavell A.J. (1996). The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Molecular Genetics and Genomics*. 250: 305–315.

Pedrosa-Harand A., de Almeida C.C., Mosiolek M., Blair M., Schweizer D., Guerra M. (2006). Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*. 112: 924–933.

Poke F., Vaillancourt R., Potts B., Reid J. (2005). Genomic research in eucalyptus. *Genetica*. 125: 79–101.

Pollock E.G. (1957). The sex chromosomes of maidenhair tree. *Journal of Heredity*. 48: 290–94.

- Prado E., Faivre-Rampant P., Schneider C., Darmency M. (1996). Detection of a variable number of ribosomal DNA loci by fluorescent in situ hybridization in *Populus* species. *Genome*. 39: 1020–1026.
- Pruitt R., Meyerowitz E. (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana* . *Journal of Molecular Biology*. 187: 169–183.
- Puizina J., Sviben T., Krajacic-Sokol I., Zoldos-Pecnik V., Siljak-Yakovlev S., Papes D. & Besendorfer V. (2008). Cytogenetic and molecular characterization of the *Abies alba* genome and its relationship with other members of the Pinaceae. *Plant Biology*. 10: 256-267.
- Qiu D., Li R. & Li L. (1998). Studies on the somatic embryogenesis of *Taxus chinensis* and *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Scientia Silvae Sinicae*. 34: 50–54.
- Renner S. S., and Ricklefs R. E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants.
- Ribeiro T., Barão A., Viegas W., Morais-Cecílio L. (2008). Molecular cytogenetics of forest trees. *Cytogenetic and Genome Research*. 120: 220-227.
- Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C., e Berg P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology*. 113: 237-241.
- Rogers D. (1997). Inheritance of allozymes from seed tissues of the hexaploid gymnosperm, *Sequoia sempervirens* (d. Don) Endl. (coast redwood). *Heredity*. 78: 166–175.
- Rogers S., Bendich A. (1987). Ribosomal RNA genes in plants: Variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology*. 9: 509–520.
- Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., et al. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 434: 325–337.
- Ruiz Rejòn M. (2004). Sex chromosomes in plants. In: Encyclopedia of Plant and Crop Sciences (Vol 6): Dekker Agropedia (6vols), Marcel Dekker Inc., New York. 1148-1151.
- Sax K. & Sax H.J. (1933). Chromosome number and morphology in the conifers. *Journal of the Arnold Arboretum*. XIV: 356-374.
- Saiki R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.
- Salis A. (2012). Struttura e sex-ratio in *Taxus baccata*, tesi di dottorato. Corso di dottorato in Scienze e Tecnologie per la gestione ambientale e forestale – XXIII Ciclo. Discussa nell’a.a 2011/2012..rel B. Schirone.
- Särkilähti E. (1988). Micropropagation of a mature colchicine-polyploid and irradiation-mutant of *Betula pendula* Roth. *Tree Physiology*. 4: 173–179.

- Schirone B., Bellarosa R. and Piovesan G. (eds) (2003). *Il tasso – Un albero da conoscere e conservare*, Penne (PE). Cogecstre Edizioni.
- Scalfi M., Troggio M., Piovani P., Leonardi S., Magnaschi G., et al. (2004). A RAPD, AFLP and SSR link are map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 433– 441.
- Schmidt A., Doudrick R., Heslop-Harrison J., Schmidt T. (2000). The contribution of short repeats of low sequence complexity to large conifer genomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 7–14.
- Schneck V. (1996). Investigation of the dependence of clone in rootability and the quality of the root system of propagation by cuttings of 40 to 350-years old yew (*Taxus baccata* L.) trees. *Silvae Genetica* 45(5/6): 246-249.
- Schweizer D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. (Berl.) 58: 307–324.
- Segawa M., Kishi S., Tatuno S. (1971). Sex chromosomes of *Cycas revoluta*. *Japanese Journal of Genetics*. 46:33–39.
- Sewell M., Sherman B., Neale D. (1999). A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics*. 151: 321–330.
- Shibata F., Matsusaki Y., Hizume M. (2005). AT-rich sequences containing *Arabidopsis* -type telomere sequence and their chromosomal distribution in *Pinus densiflora* . *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 1253–1258.
- Shibata F. & Hizume M. (2008). Comparative FISH karyotype analysis of 11 *Picea* species. *Cytologia*. 73: 203-211.
- Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stoian V., Brown S., et al. (2002). Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 505–512.
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., et al. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 423: 825– 837.
- Slichenmyer W.J., Rowinsky E.K., Donehower R.C., and Kaufmann S.H. (1993). The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute*. 85, 271.
- Smal C.M. Fairley J.S. (1980). Food of wood mice and bank voles in oak and yew woods at Killarney Ireland. *Journal of Zoology*. 191: 413-418.
- Smith C.A., Roeszler K.N, Ohnesorg T. et al. (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*. 461: 267–271.
- Sola-Campoy Pedro J., de la Herrán R., Ruiz Rejón C., Navajas-Pérez R. (2012). Plant sex-chromosomes evolution In: *New Insights on Plant Sex Chromosomes (Chapter I)* 1-20. Edited by: Rafael Navajas-Pérez. Nova Publishers. Febr-2012 isbn: 978-1-61470-236-8.

- Steinemann, M., Steinemann S. (1997). The enigma of Y chromosome degeneration: TRAM, a novel retrotransposon is preferentially located on the Neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Genetics*. 145(2): 261-266.
- Stull, D.P. (1992). Current taxol production from yew bark and future production strategies. Second National Cancer Institute Workshop on Taxol and *Taxus*. September 23-24, 1992, Alexandria, Virginia (abstract).
- Tagashira N. & Kondo K. (2001). Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution*. 227: 145-155.
- Taketa S., Ando H., Takeda K., van Bothmer R. (1999). Detection of *Hordeum marinum* genome in three polyploid *Hordeum* species and cytotypes by genomic *in situ* hybridization. *Hereditas*. 130: 185–188.
- Tautz, D. (1988). Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17: 6463-6471.
- Telgmann-Rauber A., Jamsari A., Kinney M. S., Pries J. C. and Jung C. (2007). Genetic and physical maps around the sex-determining M -locus of the dioecious plant asparagus. *Molecular Genetics and Genomics*. 278: 221–234.
- Thomas P.A., Polwart A., (2003). *Taxus baccata* L. *Journal of Ecology*, 91: 489-524.
- Tittensor R.M. (1980). Ecological History of Yew *Taxus baccata* L. in Southern England. *Biological Conservation*. 17: 243-265.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 313: 1596–1604.
- Vaio M., Speranza P., Valls J., Guerra M., Mazzella C. (2005). Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*. 96: 191–200.
- Vischi M., Jurman I., Bianchi G., Morgante M. (2003). Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 591–597.
- Vessella F., Schirone B. (2011). Regeneration processes and sexual behaviour of yew populations in Italy. In: 17th International meeting of Eibenfreunde. Paterzell (Germany), 8-10 October 2010 (17): 69-84. MARKGRONINGEN: Scheeder T. (Ed), ISBN: 978-3-00-034790-0.
- Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A., Ausubel F.M., Rodermeil S.R. (1992). Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 89: 7124–7128.
- Wani M., Taylor H., Wall M., Coggon P., McPhail A. (1971). "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*". *Journal of the American Chemical Society*. 93(9): 2325–7.
- Wann S.R. & Goldner W.R. (1994). Induction of somatic embryogenesis in *Taxus*, and the production of taxane-ring containing alkaloids there from. WO Patent No. 93/19585.

- Watt A.S. (1926). Yew communities on the South Downs. *Journal of Ecology*. 14: 282-316.
- Wellmer F., Riechmann J.L., Alves-Ferreira M., Meyerowitz EM. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*. 15: 1314-26.
- Westergaard M. (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in Genetics*. 9: 217-8.
- Whelan Jo. (2002). "Targeted taxane therapy for cancer". *Drug Discovery Today*. 7(2): 90-2.
- White J.E.J., (1998). Estimating the age of large and veteran trees in Britain. *Forestry Commission Information Note 012*. HMSO/Forestry Commission, London, UK.
- Wicke S., Costa A, Muñoz J, Quandt D. (2011). Restless 5S: The re-arrangement(s) of nuclear ribosomal DNA in land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 321-332.
- Wright J.W. (1976). Introduction to Forest Genetics. *Academic Press*. New York.
- Wyatt R., Anderson L.E. (1984). Breeding systems of Bryophytes. In *The Experimental Biology of Bryophytes*. ed. AF Dyer, JG Duckett. 39-64. London: Academic.
- Yu Q., Hou S., Feltus F. A., Jones M. R., Murray J. E. et al. (2008a). Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. *The Plant Journal*. 53: 124-132.
- Zarek M., (2007). A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under *In vitro* conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 43: 623-630;8.
- Zhang X., Wessler SR. (2004). Genome-wide comparative analysis of the transposable elements in the related species *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 101: 5589-5594.
- Zhang X., Feng B., Zhang Q., Zhang D., Altman N., Ma H. (2005). Genome-wide expression profiling and identification of gene activities during early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 58: 401-19.
- Zhang, W., Wang X., Yu Q., Ming R., Jiang J. (2008). DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome Research*. 18: 1938-1943.
- Zhang S.G., Yang W.H., Han S.Y., Han B.T., Li M.X. & Qi L.W. (2010). Cytogenetic analysis of reciprocal hybrids and their parents between *Larix leptolepis* and *Larix gmelinii*: implications for identifying hybrids. *Tree Genetics & Genomes*. 6: 405-412.
- Zimmer E., Jupe E., Walbot V. (1988). Ribosomal gene structure, variation, and inheritance in maize and its ancestors. *Genetics*. 120: 1125-1136.
- Zoldos V., Papes D., Cerbah M., Panaud O., Besendorfer V., Siljak-Yakovlev S. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics*. 9: 969-977.
- Zonneveld B.J.M. (2012). Genome sizes of 172 species, covering 64 out of the 67 genera, range from 8 to 72 picogram. *Nordic Journal of Botany*. 30: 490-502.