

Università della Calabria
Facoltà di Scienze M.F.N.-Dipartimento di Ecologia

Tesi di Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale
XXII ciclo-Settore disciplinare BIO/01

Plantago brutia e Plantago media: uso di
marcatori molecolari per indagare
relazioni filogenetiche

Docente tutor

Dott.ssa Anna Maria Palermo

Anna Maria Palermo

Candidata

Dott.ssa Assunta De Vita

Assunta De Vita

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Aldo Musacchio

Aldo Musacchio

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag 3
Biodiversità ed endemismi	“ 3
La famiglia delle <i>Plantaginaceae</i>	“ 6
Il genere <i>Plantago</i>	“ 8
Le specie <i>Plantago media</i> e <i>Plantago brutia</i>	“ 13
Indagini Molecolari	“ 18
Marcatori nucleari	“ 19
Marcatori plastidiali	“ 21
Marcatori microsatellitari	“ 24
MATERIALI E METODI	“ 25
Campionamento	“ 25
Estrazione del DNA	“ 28
Elettroforesi su gel d'agarosio	“ 29
Amplificazioni	“ 30
Analisi dei dati	“ 38
RISULTATI E DISCUSSIONE	“ 41
ITS1	“ 42
ITS2	“ 42
<trnl< td=""><td>“ 47</td></trnl<>	“ 47
<trnl-trnf< td=""><td>“ 50</td></trnl-trnf<>	“ 50
accD-psa1	“ 53
atpB-rbcL	“ 56
Analisi combinata nucleare-plastidiale	“ 59
psbI-psbK	“ 63
CONCLUSIONI	“ 67
BIBLIOGRAFIA	“ 70

INTRODUZIONE

Biodiversità ed endemismi

Il termine Biodiversità, reso popolare dall'evoluzionista Wilson nel 1988, è usato per definire la varietà delle forme viventi sulla Terra.

La Convenzione sulla Diversità Biologica, sottoscritta allo scopo di tutelare la biodiversità del pianeta, ha definito la “diversità biologica” come *la variabilità di organismi viventi di ogni origine inclusi gli ecosistemi terrestri, marini e altri ecosistemi acquatici, e i complessi ecologici di cui fanno parte; ciò implica la diversità all'interno delle specie, tra le specie e tra gli ecosistemi.* (articolo 2).

Inoltre la biodiversità può essere definita come un concetto non statico, ma dinamico, in continua evoluzione; per cui non solo è il risultato di processi evolutivi, ma anche serbatoio da cui attinge l'evoluzione, per poter attuare tutte quelle modifiche genetiche e morfologiche, che danno origine a nuove specie viventi. Si può pertanto affermare che la biodiversità è contemporaneamente causa ed effetto della diversità genetica.

Speciazioni ed estinzioni sono fenomeni naturali che si sono susseguiti, nel corso delle Ere, portando alla vita così come la conosciamo oggi.

La biodiversità del Pianeta è andata diminuendo progressivamente e tale riduzione si è accentuata per un concorso di cause tra cui: la distruzione degli *habitat* (es.: bonifiche e deforestazioni); le pratiche agricole intensive; la frammentazione del paesaggio; il *climate change*; l'*over grazing*; l'insediamento di specie invasive.

L'Italia è il paese europeo con la maggiore biodiversità, almeno per

numero di specie e di sistemi ecologici. Questo primato è dovuto alla posizione geografica, in quanto l'Italia è tra i paesi più meridionali d'Europa e allo stesso tempo è il più settentrionale del Mediterraneo. In Italia sono presenti 57.468 specie animali e circa 9.000 specie vegetali: nel complesso è presente oltre 1/3 delle specie animali distribuite in Europa e quasi il 50% della flora europea su una superficie di circa 1/30 di quella del continente.

La posizione centrale occupata dall'Italia nell'area mediterranea ha, senza dubbio, facilitato i fenomeni di colonizzazione da parte di specie provenienti dalle terre circostanti, in particolare da occidente, da sud e da oriente. Questa è tra le cause principali della elevata biodiversità del nostro paese.

Si ipotizza che durante il Quaternario l'alternanza fra fasi fredde o glaciali e fasi temperate ha modificato continuamente la copertura vegetale, che si è ridotta alle sole aree rifugio durante le glaciazioni e ha dato vita a successive migrazioni al sopraggiungere di nuovi momenti di clima temperato.

L'Italia meridionale, in particolare, rappresenta l'estremo limite meridionale di molte specie a larga diffusione europea. Sul Massiccio del Pollino l'avvento dei ghiacciai nel corso dell'ultima glaciazione, avvenuta tra 100.000 e 12.000 anni fa, ha definito la morfologia delle vette, forme glaciali si conservano nell'area circoscritta dalle cime di Serra del Prete, Monte Pollino, Serra Dolcedorme. Molte specie vegetali sono scese da nord a sud mantenendosi nei rifugi. Queste aree, a causa del loro isolamento geografico, sono diventate un importante serbatoio di diversità genetica, che si è conservata nel tempo nonostante la forte pressione antropica.

Parte di questa diversità è rimasta circoscritta, generando molto spesso l'insediamento di specie endemiche, mentre parte ha contribuito alla colonizzazione del resto d'Italia e d'Europa.

In un programma di conservazione della biodiversità la presenza di specie endemiche è uno dei primi fattori da valutare, al fine di definire un piano di intervento che miri a preservare, in modo prioritario, quegli organismi che non sono presenti altrove.

Aree ricche di specie endemiche possono essere zone di speciazione attiva (zone in cui l'evoluzione continua a proporre nuove specie) o rifugio di residui evolutivi (zone dove si sono conservate le specie).

Nella valutazione della biodiversità è necessario indicare non solo il tipo di endemismo, ma anche la precisa definizione e delimitazione delle aree in cui è presente. Più piccola è l'area dell'endemismo e maggiore è il rischio per la specie endemica di scomparire a causa del suo isolamento, più tempestivi devono essere gli interventi di salvaguardia.

La famiglia delle *Plantaginaceae*

Alla famiglia delle *Plantaginaceae*, Juss. (1789), appartengono piante spermatofite dicotiledoni, in maggioranza a portamento erbaceo e, dopo la riorganizzazione, anche arbustivo con alcuni generi acquatici.

Alcuni generi presentano infiorescenze a spiga allungata o globosa, altre a fiori singoli. I fiori sono attinomorfi, ma anche zigomorfi, sono ermafroditi ma anche unisessuali. In genere sono tetraciclici, pentameri o tetrametri.

Nelle vecchie classificazioni questa famiglia comprendeva solamente tre generi (*Bougueria*, *Littorella*, e *Plantago*). La posizione sistematica di questa famiglia è sempre stata molto discussa, e tuttora è ancora in via di sistemazione tassonomica.

All'inizio del secolo scorso, il botanico tedesco Heinrich Gustav Adolf Engler (1844 – 1930), famoso per i suoi lavori sulla tassonomia delle piante, aveva isolato questa famiglia in un ordine apposito, le *Plantaginales*. In contrapposizione, Richard von Wettstein (1863 – 1931), botanico austriaco e primo ad aver introdotto un sistema di classificazione filogenetico delle piante, l'aveva sistemata nell'ordine delle *Tubiflorae*. Mentre il botanico americano Charles Bessey (1845 – 1915) l'aveva posta fra le *Pimulales*.

In tempi più moderni (anni '80), Arthur Cronquist (1919 – 1992) pubblica alcuni testi nei quali propone una sua classificazione della famiglia delle *Plantaginaceae* inserendola nell'ordine delle *Plantaginales*; ma è di questi ultimi anni una proposta ancora più innovatrice da parte dell'Angiosperm Phylogeny Group che assegna la famiglia all'ordine delle *Lamiales*.

La famiglia delle *Plantaginaceae* comprende circa 90 generi per un totale di oltre 2000 e più specie che variano grandemente nell'estensione della loro distribuzione, con alcune che si insediano nelle sole isole oceaniche, pertanto endemiche di particolari aree geografiche, ed altre con distribuzione cosmopolita (Fig. 1)

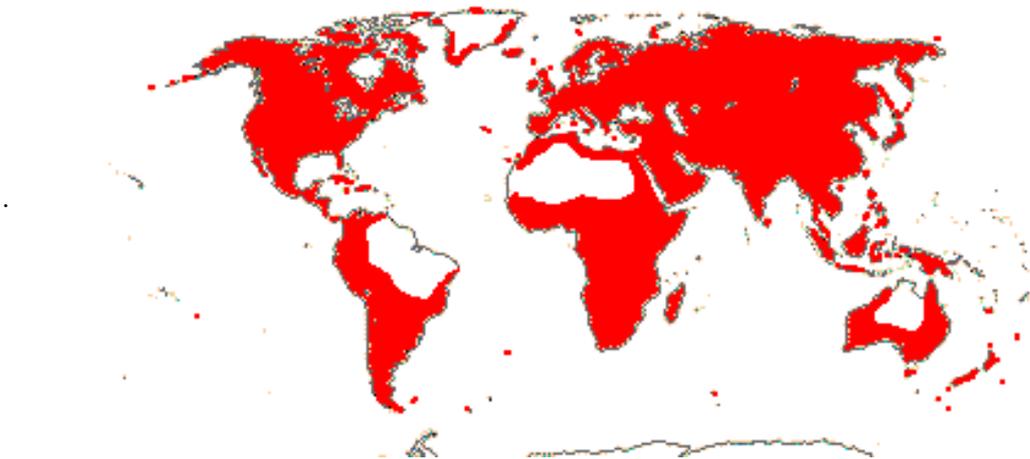


Figura 1 – Areale di distribuzione delle *Plantaginaceae*

Il genere *Plantago*

Il genere *Plantago* comprende circa 200 - 260 specie, che variano dalle forme primaverili annuali, alle estive annuali, biennali e perenni. Molte specie sono erbe con foglie basali disposte a rosetta, altre formano tappeti o piccoli arbusti. Crescono in un intervallo estremo di habitat, che include montagne tropicali, deserti, scogliere, foreste e aree disturbate. Le diverse specie variano molto nell'estensione della loro distribuzione, con alcune ad areale ristretto e altre più ampio.

Sebbene il suo centro di diversificazione si ritiene essere l'Asia centrale, alcune specie sono largamente disperse con la massima concentrazione nelle regioni temperate.

L'impollinazione è anemofila. Il genere ha tre numeri cromosomici di base, $x = 4, 5$ e 6 (Rahn 1996, Dhar et al. 2006); il numero diploide di cromosomi varia da $2n = 8$ (*P. ovata*) a $2n = 96$ (*P. correae*).

Le sue diverse proprietà chimiche ed i diversi sistemi riproduttivi (es: auto-incompatibilità e auto-compatibilità; dicogamia, cosessualità, ginodiecia o diecia, fiori unisessuali femminili o ermafroditi) hanno attirato l'interesse di numerosi ricercatori (vedi Wolff and Schaal 1992; Van Dijk and Bakx-Schotman 1997; Rønsted et al. 2000; Squirrell and Wolff 2001; Hale and Wolff 2003; Rønsted et al. 2003; Nilsson and Ågren 2006; Nilsson et al. 2006). Le specie appartenenti a questo genere sono state molto utili per molti studi di genetica di popolazione e studi di tipo evolutivo, proprio perché si trattava di specie comuni e ad ampia distribuzione (Wolff 1987, Wolff 1991).

Plantago è un gruppo di piante in cui le relazioni filogenetiche sono ancora oggi studiate ed investigate. In uno studio esaustivo condotto da Rahn (1996), e basato sullo studio di 91 principali caratteri morfologici ed embriologici, il genere, considerato monofiletico, si può suddividere in sei sottogeneri: *Plantago*, *Coronopus*, *Littorella*, *Psyllium*, *Bourgeria*, *Albicans*; e un certo numero di sezioni e serie (Tabella 1).

Tabella 1 – Sottogeneri di *Plantago* in accordo con Rahn (1996)

N° di specie	Sottogeneri, sezioni e serie	Distribuzione
1-42	<i>Plantago</i> sect. <i>Plantago</i>	Africa, Asia, Europa, N America, Oceania
43-48	<i>Plantago</i> sect. <i>Micropsyllium</i>	America, Asia, Europa
49-80	<i>Plantago</i> sect. <i>Mesembrynia</i>	Australia, Nuova Zelanda, Amsterdam e isola di San Paolo
81-108	<i>Plantago</i> sect. <i>Virginica</i>	N e S America
109-116	<i>Plantago</i> sect. <i>Oliganthos</i> ser. <i>Oliganthos</i> S.	America, Auckland, Tasmania
117-118	<i>Plantago</i> sect. <i>Oliganthos</i> ser. <i>Carphophorae</i>	Ande e Messico
119-131	* <i>Plantago</i> sect. <i>Oliganthos</i> ser. <i>Microcalyx</i>	Nuova Guinea, Australia, Nuova Zelanda
132-135	<i>Coronopus</i> sect. <i>Maritima</i>	Mediterraneo
136-142	<i>Coronopus</i> sect. <i>Coronopus</i>	Mediterraneo
143-145	<i>Littorella</i>	N e S America, Europa
146-161	<i>Psyllium</i> Mediterranean,	Macaronesia
162	<i>Bougueria</i>	Ande

Tabella 1 – Sottogeneri di *Plantago* in accordo con Rahn (1996)

N° di specie	Sottogeneri, sezioni e serie	Distribuzione
163–168	<i>Albicans</i> sect. <i>Montana</i>	N e S Africa, Spagna, C Europa, O Asia
169–174	<i>Albicans</i> sect. <i>Lanceifolia</i>	Mediterraneo
175	<i>Albicans</i> sect. <i>Bauphula</i>	N Africa, O Asia
176–178	<i>Albicans</i> sect. <i>Hymenopsyllium</i>	Mediterraneo
179	<i>Albicans</i> sect. <i>Albicans</i> ser. <i>Ovatae</i>	Mediterraneo, NO Ameri
180–182	<i>Albicans</i> sect. <i>Albicans</i> ser. <i>Minutae</i>	C e O Asia
183–185	<i>Albicans</i> sect. <i>Albicans</i> ser. <i>Albicantes</i>	Mediterraneo
186–190	<i>Albicans</i> sect. <i>Albicans</i> ser. <i>Ciliatae</i>	N Africa, O Asia
191–195	<i>Albicans</i> sect. <i>Gnaphaloides</i> ser. <i>Hispidulae</i>	Cile, Perù
196–203	<i>Albicans</i> sect. <i>Gnaphaloides</i> ser. <i>Sericeae</i>	Messico, Guatemala, Ande, E Argentina
204–206	<i>Albicans</i> sect. <i>Gnaphaloides</i> ser. <i>Brazilienses</i>	Cile, Argentina, Uruguay, S Brasile
207–213	<i>Albicans</i> sect. <i>Gnaphaloides</i> ser. <i>Gnaphaloides</i>	N America, Argentina

Un certo numero di studi tassonomici hanno valutato l'uso dei glucosidi-iridoidi come marcatori chimici in *Plantago* (Andrzejewska-Golec, 1997). I glucosidi-iridoidi sembrano essere valutabili come caratteri tassonomici a livello di sottogenere e sezione, ma non risolvono le relazioni fra specie, in parte a causa del ristretto numero di composti. Un altro studio, che ha usato dati molecolari per studiare le relazioni di cinque specie di *Plantago* ha impiegato la variabilità nei siti di restrizione (Wolff e Schaal, 1992) e il risultato era in accordo con la tassonomia di Rahn(1996). In uno studio sulla struttura del genoma mitocondriale delle Angiosperme, Palmer et al. (2000) ha trovato che *Plantago* è una delle due linee con la più alta velocità di sostituzioni, che però non è uniforme in tutte le specie di *Plantago*.

Più di recente, nel 2002, Rønsted ed altri, hanno ridotto i sottogeneri a cinque, includendo *Albicans* nel sottogenere *Psyllium*. e basandosi sui dati ottenuti da uno studio eseguito sulle regioni nucleari (ITS) e plastidiali (*trnL-F*).

Le specie *Plantago media* e *Plantago brutia*

Le specie europee di *Plantago media* appartengono al sottogenere *Plantago*. Pilger (1937) includeva in questo sottogenere 5 varietà di questa specie: var. *media* per l'Europa centrale; var. *urvilleana* Rapin per la Crimea; var. *glabra* Baguet, diffusa in tutto il range della specie; var. *brutia* (Ten.) Rapin per la Calabria (S Italia); var. *pindica* Hausskn. per la Grecia; var. *nevadensis* Willk. per la Spagna.

Greuter & Burdet (1982) elevarono la var. *pindica* al rango di sottospecie (*P. media* subsp. *pindica* (Hausskn.) Greuter et Burdet). Successivamente Greuter et al. (1986) trattò con alcuni dubbi, la var. *brutia*, la var. *nevadensis* e la var. *urvilleana* nello stesso modo (*P. media* subsp. *bruria* (Ten.) Arcangeli; *P. media* subsp. *nevadensis* (Willk.) Malagarriga; *P. media* subsp. *stepposa* (Kuprian) Soò) considerando *P. stepposa* sinonimo con *P. media* var. *urvilleana* Rapin. Hanno aggiunto l'Albania e l'ex Jugoslavia nella distribuzione di *P. media* subsp. *pindica* e ampliato la distribuzione di *P. media* subsp. *stepposa* all'intera regione meridionale di *P. media*, includendo la Spagna, dove la subsp. *stepposa* può essere parapatrica con la subsp. *nevadensis*.

Studi precedenti eseguiti su popolazioni di *P. media* (Fig.2), una specie cosmopolita con una distribuzione frammentata in Europa, con limite settentrionale in Norvegia (Alm et al., 1997) e limite meridionale in Abruzzo, hanno messo in evidenza che questa specie rappresenta un complesso poliploide (diploide con $2n = 12$ e tetraploide con $2n = 24$). Partendo dal concetto che la poliploidizzazione è un importante processo nel percorso evolutivo delle piante, è stato osservato che le

popolazioni con assetto cromosomico diploide sono generalmente caratterizzate da una distribuzione frammentata e spesso presente in rifugi, in contrapposizione ad una distribuzione continua ed estesa di quelle tetraploidi. Inoltre le popolazioni diploidi pare siano quelle poste più a sud rispetto a quelle tetraploidi che hanno distribuzione più nordica. Recenti studi molecolari (Van Dijk and Bakx-Schotman, 1997), condotti su piante di questa specie presenti nella Spagna centrale, sembrano dimostrare che le popolazioni relitte della penisola iberica, con assetto cromosomico diploide, sono le più primitive originatesi prima delle glaciazioni del periodo quaternario.

Per quanto concerne il citotipo diploide di *P. media*, comparando dati citogeografici con quelli forniti da Greuter et al. (1986), per le varie sottospecie, si può riscontrare che i diploidi possono essere identificabili con la sotto specie *nevadensis*, endemica della Spagna, e con la sottospecie *stepposa*, che si trova a sud e a sud-est d'Europa.

In contrasto, Zemskova (1977) considera il citotipo diploide di *P. media* come proveniente dalla Russia e quello tetraploide di *P. stepposa* come proveniente dalla zona della Turchia. Pertanto, la questione della variabilità infraspecifica di *P. media* presenta ancora dubbi sia da un punto di vista tassonomico che biosistemico.

Plantago brutia (Fig.3), una specie che si insedia sulle montagne del Parco del Pollino, risulta da uno studio effettuato durante il mio lavoro di tesi, basato sull'uso di marcatori molecolari quali gli ISSR, non avere sperimentato né collo di bottiglia né deriva genetica, eventi che portano ad una perdita di diversità genetica (De Vita et al., 2009).

Questa specie è stata elevata a tale rango tassonomico recentemente, da studi cariologici e morfologici condotti presso l'orto botanico

dell'Università della Calabria (Peruzzi e Gargano, 2006); le sue popolazioni sono state per molto tempo considerate una varietà di *P. media*, ma già Tenore le aveva descritte come *P. brutia* (1824 - 1829). Successivamente Pilger (1937) le considerò come una varietà di *P. media*. Pignatti invece nella Flora d'Italia (1982) riporta solo *P. media*, ma evidenzia in una nota, l'esistenza, sul Massiccio del Pollino, di piante alle quali assegna una dubbia valenza tassonomica. Conti et al. (2005) riporta per l'Italia *P. media* subsp. *media* e come endemica, *P. media* subsp. *brutia*.

P. brutia presenta un assetto cromosomico sempre diploide con $2n = 12$; si differenzia da *P. media* per il colore dei filamenti degli stami che si presentano bianchi, per le foglie appena dentate e infiorescenza ellittica leggermente più corta (Peruzzi e Gargano, 2006).



Figura 2 – *Plantago media*



Figura 3 – *Plantago brutia*

Indagini molecolari

Partendo dalla valutazione di tali incertezze nella classificazione, si è deciso di effettuare un'indagine attraverso l'uso di diversi marcatori molecolari, per cercare di chiarire la posizione filogenetica di *Plantago brutia* rispetto alla affine *Plantago media*.

Oggi gli studi tassonomici si avvalgono della biologia molecolare ed in particolare delle informazioni derivanti dall'analisi di mutazioni accumulate, nel corso dell'evoluzione, all'interno di sequenze del DNA. Tenendo conto del fatto che le mutazioni sono eventi indelebili del genoma di una specie, è possibile affermare che due taxa con la stessa sequenza, o comunque distinti da pochi eventi di mutazione, derivano dallo stesso progenitore e quindi appartengono a specie filogeneticamente vicine.

L'analisi molecolare ha rivoluzionato la panoramica delle relazioni filogenetiche, soprattutto per la semplicità e l'abbondanza di caratteri che questa mette a disposizione, ma anche per l'elevato grado di oggettività e di attendibilità, contrariamente ai caratteri morfologici, troppo spesso influenzabili da fattori esterni.

Già da lungo tempo è uso indagare le regioni non trascritte del genoma vegetale, che subiscono cambiamenti evolutivi rapidi sia di struttura che di sequenza e che consentono di generare attendibili ipotesi filogenetiche (Baldwin, 1992).

Marcatori nucleari

Il genoma nucleare ed in particolare i geni che codificano per l'RNA ribosomiale eucariotico (rDNA), sono divenuti un importante strumento per la sistematica molecolare a bassi livelli tassonomici, perché presentano delle regioni spaziatrici non espresse, facilmente amplificabili, in quanto sono ripetuti in copie multiple e sono fiancheggiati da regioni altamente conservate, che consentono l'applicazione di primers universali (Mort et al., 2007). Questi spaziatori vengono pertanto largamente testati ed usati nelle piante per ricerche filogenetiche a livello di specie, grazie alla loro alta velocità evolutiva, perché presentano una sequenza di basi relativamente corta e mostrano alti livelli di divergenza interspecifica. In particolare, le sequenze localizzate tra i geni che codificano per il 18S ed il 5.8S (ITS1) e per il 5.8S e il 26S (ITS2), sono spaziatori largamente indagati ed usati nelle piante. Baldwin (1992) è stato il primo ad aver dimostrato in maniera precisa l'utilità della regione ITS per la ricostruzione filogenetica nelle *Asteraceae*. Altri esempi di studi che hanno usato le sequenze ITS riguardano Wojciechowski et al. (1993) su *Astragalus* (Fabaceae) ed Hodges & Arnold (1994) su *Aquilegia* (Ranunculaceae).

Negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta anche ad altri tratti nucleari come il secondo introne del LEAFY, un gene nucleare omeotico, che regola il tempo di fioritura (Blázquez et al., 1997) o anche la regione dell'ETS, fiancheggiata dallo spaziatore NTS e dal gene ribosomiale 18S; quest'ultima è stata usata come una valida fonte di informazioni per studi filogenetici a bassi livelli tassonomici nelle *Asteraceae* (Morgan, 2003), anche se in molti altri gruppi di angiosperme i primers disegnati

per questo tratto non hanno dato risultati utili.

Marcatori plastidiali

Le sequenze di DNA plastidiale sono una fonte primaria di dati per dedurre la filogenesi vegetale, rivali negli ultimi anni forse solo alle sequenze di DNA nucleare ribosomale (Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995; Álvarez e Wendel, 2003). All'inizio dell'era della sistematica molecolare vegetale, il DNA plastidiale (cpDNA) è stato studiato soprattutto attraverso i polimorfismi dei siti di restrizione (Olmstead e Palmer, 1994). La facilità di generare dati dalle sequenze del DNA ha portato ad un'esplosione di analisi di studi comparativi delle sequenze di geni del DNA plastidiale.

Il cpDNA è presente, con centinaia di copie nella cellula vegetale, ha dimensioni relativamente piccole, tra 120 e 170 kb. Con poche eccezioni, ciascuna molecola circolare comprende due regioni chiamate inverted repeat (IR), ovvero due regioni con orientamento opposto e complementari tra loro. Le due regioni IR sono separate, in maniera asimmetrica, da una piccola (SSC) e una grande (LSC) regione a singola copia (Fig.4). Studi sull'evoluzione del genoma plastidiale hanno dimostrato il suo alto grado di conservazione in lunghezza, struttura e presenza dei geni. Esso contiene geni per tutte le specie di rRNA, molti geni per i tRNA plastidiali, geni per le subunità dell'RNA polimerasi, molte proteine ribosomali e fattori di trascrizione. La sua caratteristica è di essere ereditato per via uniparentale. Generalmente i plastidi nelle Angiosperme sono ereditati per via materna e quindi dispersi solo attraverso i semi. Poiché la colonizzazione di nuovi habitat avviene attraverso i semi, i marcatori del DNA plastidiale forniscono informazioni sui cambiamenti che avvengono nel corso del tempo, nella distribuzione

della specie, che non sono influenzati dal movimento successivo del polline (Shaw et al., 2007). Alla luce di tutto ciò è facilmente intuibile che ogni modificazione nella struttura, nel riarrangiamento o nel contenuto del genoma del cloroplasto, possa riflettere significative implicazioni tassonomiche, utili per confronti tra le principali linee evolutive vegetali (Shaw et al., 2007).

Nelle piante, l'analisi del DNA plastidiale è diventata predominante coinvolgendo all'inizio, geni come *rbcL*, *matK*, o *ndhF* (Chase et al., 1993; Olmstead e Palmer, 1994; Olmstead e Sweere, 1994; Steel e Vilgalys, 1994). In seguito, è diventato più comune il sequenziamento di regioni non codificanti del cpDNA, che si ritengono essere più utili a livelli tassonomici inferiori, perché sono funzionalmente meno limitati e sono quindi più liberi di variare, fornendo in tal modo potenzialmente un maggior numero di caratteri informativi (Clegg et al., 1994).

I marcatori plastidiali della regione del *trnL-trnLF*, che comprende un introne (*trnL*) e uno spaziatore intergenetico (*trnL-trnF*), sono oggi divenuti di largo uso per analisi di tipo filogenetico (Quandt et al., 2004).

Un altro tratto informativo è l'*atpB-rbcL*, spaziatore di circa 900 bp, compreso tra il gene per l'*atpB* localizzato nella regione della LSC del genoma plastidiale e il gene *rbcL* che codifica per la subunità β dell'ATP sintetasi (Gatenby et al., 1989). Questo gene è stato suggerito come ottimo candidato per il barcode sulle piante ed è stato inoltre usato spesso per determinare le relazioni evolutive a livello di genere.

Un altro sito interessante è l'introne compreso tra i geni *psbK* e *psbI* che

codificano per due piccoli polipeptidi del fotosistema II. Questi due loci sono conservativi nelle alghe e nelle piante terrestri (Lahaye et al., 2008).

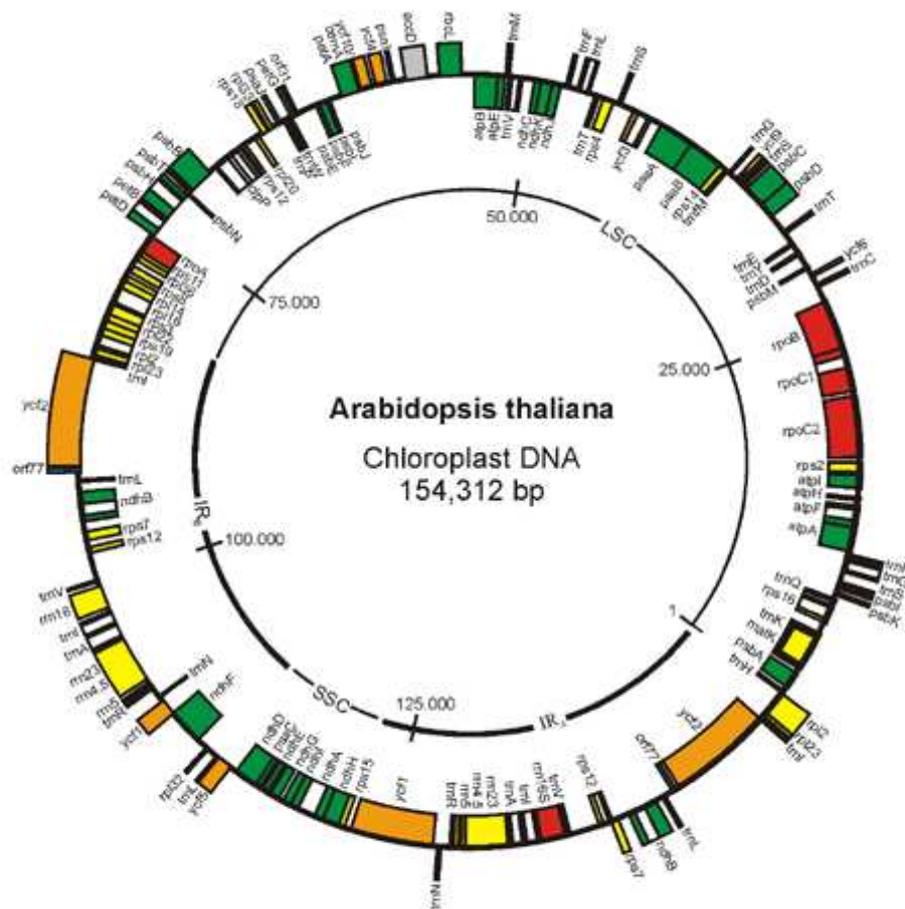


Figura 4 - cpDNA

Marcatori microsatellitari

I microsatelliti sono delle sequenze nucleotidiche di 2-8 bp ripetute più volte in successione formando sequenze di 20-100 bp. La ripetizione (AT) n è la più frequente nelle piante, mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione (AC) n (Powell *et al.*, 1996). Questi elementi ripetuti, considerati in precedenza come sequenze di DNA superfluo, oggi si ritiene abbiano un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, nel mantenimento dell'integrità strutturale dei cromosomi e nella formazione del centromero, nei processi di ricombinazione e riarrangiamento dell'informazione genetica, nonché negli eventi di evoluzione delle specie.

Diverse sono le caratteristiche che fanno dei microsatelliti degli ottimi marcatori genetici. L'eterozigosità dei microsatelliti produce sistemi multiallelici mostrando un livello estremamente alto di polimorfismo (60-90%), che fornisce una grande quantità di informazione genetica e consente di compiere osservazioni sia sui livelli di inbreeding che sull'entità del flusso genico all'interno e tra le popolazioni vegetali (Powell *et al.*, 1996).

MATERIALI E METODI

Campionamento

Plantago brutia Ten. è stata considerata specie endemica, con un areale di distribuzione che si estende e si limita alla sola area del Parco Nazionale del Pollino, qui si insedia con otto principali popolazioni, due in un'area sud occidentale del parco e sei nell'area centrale. Questa specie secondo il criterio B2a-b (II) del protocollo IUCN (Hilton-Taylor, 2000) risulta minacciata di estinzione (EN) e si trova al limite meridionale di distribuzione di *P. media*.

Per la realizzazione di questo lavoro sono state campionate tutte le 8 principali popolazioni, in maniera tale da coprire in modo più o meno uniforme tutto il suo areale di distribuzione (Fig.5).



Figura 5 – Area di campionamento di *P. brutia*

Per *P. media* il campionamento è stato più ampio ed ha riguardato 22 popolazioni raccolte tra l'Italia e l'Europa: 6 siti italiani (CA, Alpi Centrali; EA, Alpi Orientali; Tu, Alpi Apuane; Ab, Abruzzo; Em Appennino Bolognese; Ga, Trieste), 3 est-europei (B1, B2, Balcani, rispettivamente Bosnia & Erzegovina e Croazia; Bul, Bulgaria); 1 centro-europeo (Au, Austria); dalla Svezia (S1, S2) dalle Alpi francesi (F1, Hautes-Alpes; F2, Saint Nizier du Moucherotte; F3, Isle d'Abeau) e dalla Spagna (Bu, Burgos; Na, Navarra; Sa, Salamanca; As, Asturia; L1, L2, L3, Leon) (Fig.6).

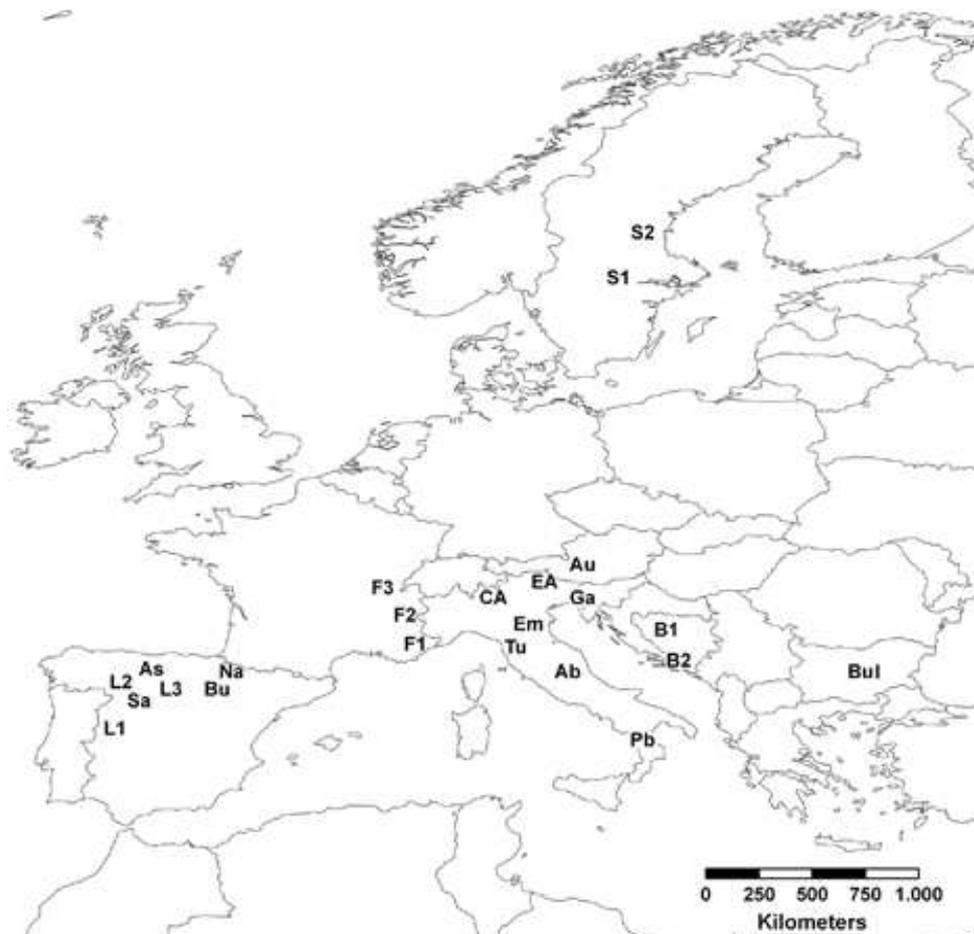


Figura 6 – Area di campionamento di *P. media*

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto sia da materiale fresco che da materiale d'erbario, applicando il protocollo di Doyle and Doyle (1991).

Il tessuto vegetale è frantumato meccanicamente in CTAB 2X, un tampone di lisi i cui componenti riescono ad inibire le attività DNAasiche (Tris-HCl 100mM pH8, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, bromuro di esadeciltrimetilammonio 2%).

Dopo aver aggiunto β -mercaptoetanololo, un antiossidante la cui funzione è quella di inibire l'azione delle perossidasi e delle polifenolo ossidasi, il tessuto frantumato è sottoposto a lisi in un bagno termostatico, alla temperatura di 60°C, per 30 minuti.

Il campione è quindi posto in ghiaccio per alcuni minuti al fine di consentire la precipitazione delle proteine polari e centrifugato a 13000 x g, per 5 minuti a 4°C.

Recuperato il sovrinatante è sottoposto a centrifugazioni seriali a 6000 x g per 15 minuti a temperatura ambiente previa aggiunta al campione di un ugual volume di cloroformio-isoamilico (24:1). Per rimuovere pareti cellulari, membrane e altri contaminanti proteici,

Il DNA è precipitato mediante l'aggiunta alla sola fase acquosa di 0,7 volumi di isopropanolo ed incubazione a -80°C per un'ora oppure a -20°C per tutta la notte. Segue una centrifugazione a 13000 x g per 10 minuti a 4°C.

Il pellet è sottoposto ad un lavaggio in etanolo freddo al 70%, asciugato e risospeso in 50 μ l di TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM), pH 7.6 o in acqua distillata sterilizzata.

Elettroforesi su gel d'agarosio

Il DNA estratto, di cui si vuole stimare la concentrazione, è sottoposto a corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8%.

L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. Fuso e gelificato, forma una matrice, la cui porosità dipende dalla concentrazione dell' agarosio.

La corsa viene eseguita in una soluzione tampone TBE 1X (Tris base 100mM, acido borico 100mM, EDTA 2mM) con l'aggiunta di bromuro d'etidio (10mg/ml) e di un marcatore di peso molecolare noto (Marker II) realizzato dalla digestione enzimatica del fago λ con l'endonucleasi di restrizione *Hind* III. Il bromuro d'etidio si intercala tra le basi del DNA, producendo una fluorescenza rosso-arancio quando viene esposto a radiazioni ultraviolette.

Amplificazioni

Con l'uso della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) sono state indagate diverse regioni del DNA. Questo è un metodo rapido, che consente di ottenere, in vitro, un elevato numero di copie di sequenze note di acidi nucleici, anche a partire da una singola molecola di DNA stampo. Si effettua mediante l'uso di una specifica coppia di primer in grado di riconoscere le regioni fiancheggianti il tratto da amplificare. Le caratteristiche che un primer deve avere sono: una lunghezza compresa tra le 18bp e le 28 bp; un quantitativo in GC compreso tra il 50% ed il 60% ed una serie di almeno due C oppure G terminali. Ogni reazione di PCR è costituita dalle seguenti fasi:

- *denaturazione* al calore (~92°C) della doppia elica di DNA con allontanamento delle proteine associate al genoma e conseguente separazione dei due filamenti;
 - abbassamento della temperatura e appaiamento (*annealing*) di coppie di oligonucleotidi (primer) che hanno una sequenza complementare ai loro siti di legame alle estremità 3' di ciascun filamento. Ciascun primer (forward e reverse), che di solito ha una lunghezza compresa tra 18 e 28 bp ed ha un contenuto di GC compreso tra il 50% ed il 60%, non deve presentare sequenze parzialmente omologhe tra loro per evitare la formazione di dimeri o strutture secondarie dell'oligonucleotide;
 - *estensione* dei primer e creazione di un nuovo filamento per opera di una DNA polimerasi. La polimerasi più comunemente utilizzata è la *Taq* polimerasi, un enzima che lavora bene alla temperatura di estensione (72°C) e non si denatura nelle prime fasi della reazione.
- Cicli ripetuti di sintesi e denaturazione danno come risultato un

incremento esponenziale.

In questo lavoro sono state indagate molte regioni: regioni del DNA nucleare, plastidiale e microsatellitari, ogni tratto è stato amplificato con primers già citati in letteratura (Tab 2, tab 3, tab 4).

Tabella 2 – Primers per il sequenziamento delle regioni nucleari

Regione	genoma	Sequenza	Bibliografia
ITS1	nucleare	JK14F GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG JK11R ATCCTGCAATTCACACCAAGTATCG	Baldwin, 1992
ITS2	nucleare	JK12R CCAAACAACCCGACTCGTAGACAGC JK27F TTGCAGAATCCCGTGAACCATCG	Baldwin, 1992
ETS	nucleare	ETS-He11 GCTCTTTGCTTGCGCAACAACACT 18S-ETS ACTTACACATGCATGGCTTAATCT	Baldwin, 1998
MAX4	nucleare	F ATMCCAYTKGAYGGRAGC R CCARCADCCRTGVARGCC	Kelly and Culham, 2008
DIGMAX	nucleare	F TATACCATTGGATGGGAGCCCAAATG R CCAACGGCCGTGCAAGCCATAG	Kelly and Culham, 2008
LEAFY	nucleare	LFY4 TTGTTGATGTAGCTTGCCCCTG LFY5 CCAGAACATTGCCAAGGAGC	Sang-Hun and Potter 2003

Tabella 3 – Primers per il sequenziamento delle regioni plastidiali

Regione	genoma	Sequenza	Bibliografia
<i>trnL</i>	plastidiale	<i>trnL1</i> CGAAATCGGTAGACGCTACG <i>trnL2</i> GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet et al., 1991
<i>trnL-trnLF</i>	plastidiale	<i>trnL3</i> GGTTCAAGTCCCTCTATCCC <i>trnL4</i> ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al., 1991
<i>accD-psa1</i>	plastidiale	<i>accDF</i> GGAAGTTTGAGCTTTATGCAAATGG <i>psa1R</i> AGACATTGCAATTGCCGAAA	Small et al., 1998
<i>rps16</i>	plastidiale	<i>rps16F</i> GAAGAACACGATCCGYTGTGGAT <i>rps16R</i> CGATAGACGGCTCATTGGGATA	Oxelmann et al., 1997
<i>trnS-trnG</i>	plastidiale	<i>trnSF</i> GCCGCTTTAGTCCACTCAGC <i>trnGR</i> GAACGAATCACACTTTTACCAG	Hamilton 1999
<i>rpl16</i>	plastidiale	<i>rpl16F</i> CGTACCCATATTTTTCCACC <i>rpl16R</i> GCTATGCTTAGTGTGTGACT	Jordan et al., 1996
<i>psbA-trnH</i>	plastidiale	<i>psbAF</i> GTTATGCATGAACGTAATGCTC <i>trnHR</i> CGCGCATGGTGGATTACAAATC	Sang et al., 1997
<i>atpB-rbcL</i>	plastidiale	<i>atpB1F</i> ACATCKARTACKGGACCAATAA <i>rbcL1R</i> AACACCAGCTTTRAATCCAA	Chiang et al., 1998
<i>pistillata</i>	plastidiale	<i>pi197F</i> GCATATGTTGGACTCAATACCA <i>pi1970R</i> ACGTTGGCTAAGTCGGTT	Goto, Meyerowitz, 1994
<i>psbk-psbl</i>	plastidiale	<i>psbK</i> TTAGCCTTTGTTTGGCAAG <i>psbl</i> AGAGTTTGAGAGTAAGCAT	Lahaye et al., 2008

Tabella 4 – Primers per il sequenziamento delle regioni microsatellitari

Regione	genoma	Sequenza	Bibliografia
JPm3§	microsatellite	F GAGCAGAGCAAACCGTTCAC R TTGCGTTGCTTGATGACATT	Squirrell and Wolf, 2001
Pm3§	microsatellite	F CTTCTCCAAGACGCAACC R CTGGTTCTAGTTTGGTATCACG	Squirrell and Wolf, 2001
Pl18	microsatellite	F TGATGCATGTGACCCTGACT R GATGGGGCTGAGTTTGAGAG	Hale and Wolff, 2003
Pl110	microsatellite	F TGTGAGATGTGTTAGCTCGGTTA R TCTGGGTTTGCTTTCTTTCC	Hale and Wolff, 2003
Pl111	microsatellite	F TGGATTCTGATGTCAGCTCAAC R TTCCCAACATTAATCGAGAGG	Hale and Wolff, 2003
Pl113	microsatellite	F AAATTCTTTTATTTACACAGTGATTGG R ATGCCAATCTGCCATGACTC	Hale and Wolff, 2003

Vengono di seguito riportati in tabella i programmi dei soli tratti amplificati con successo (Tab.5).

Tabella 5- Programmi di amplificazione

ITS 1 - ITS2		
1°step denaturazione	94°C	3 min
30 cicli	Denaturazione annealing estensione	30 sec 1 min 1 min
Estensione finale	72°C	5 min
<i>trnL</i>		
1°step denaturazione	94°C	3 min
30 cicli	Denaturazione annealing estensione	30 sec 1 min 1 min
Estensione finale	72°C	7 min
<i>trnL-trnF</i>		
1°step denaturazione	95°C	1 min
35 cicli	Denaturazione annealing estensione	1 min 1 min 45 sec
Estensione finale	72°C	7 min
<i>accD-psa1</i>		
1°step denaturazione	94°C	5 min
30 cicli	Denaturazione annealing estensione	1 min 1 min 1min e 30sec
Estensione finale	72°C	10 min

Tab 5- Programmi di amplificazione

<i>atpB-rbcL</i>		
1°step denaturazione	94°C	3 min
30 cicli Denaturazione annealing estensione	94°C 50°C 72°C	1 min 50 sec 1min e 30sec
Estensione finale	72°C	7 min
<i>trnS-trnG</i>		
1°step denaturazione	94°C	5 min
35 cicli Denaturazione annealing estensione	94°C 55°C 72°C	30 sec 1 min 1min e 45sec
Estensione finale	72°C	10 min
<i>psbK-psbI</i>		
1°step denaturazione	94°C	3 min
35 cicli Denaturazione annealing estensione	94°C 52°C 72°C	30 sec 45 sec 1 min e 30 sec
Estensione finale	72°C	5 min
<i>psbA-trnH</i>		
1°step denaturazione	95°C	2 min
30 cicli Denaturazione annealing estensione	95°C 50°C 72°C	1 min 1 min 2 min
Estensione finale	72°C	7 min

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 100 μ l, esse contenevano oltre a 5 - 10 ng di DNA genomico 10 μ l Tampone 10X, 4 μ l di $MgCl_2$, 8 μ l di dNTPs (200 μ M), 0,5 μ l di entrambi gli oligonucleotidi con concentrazione 50 μ M e 0.2 μ l di Taq DNA Polimerasi (5U/ μ l).

Le amplificazioni così ottenute sono state stimate attraverso una corsa elettroforetica su gel d'agarosio 2% in tampone TBE 1X e bromuro d'etidio (10mg/ml) unitamente ad un 100 bp low ladder Sigma-Aldrich al fine di ottenere una prima informazione sulla loro lunghezza. I campioni sono stati in seguito purificati con il kit di purificazione della Qiagen PCR e sequenziati presso la BMR Genomics di Padova seguendo il protocollo di preparazione suggerito dalla stessa azienda.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati si è preferito raggruppare tutte le derivazioni geografiche in 6 regioni, come evidenziato in tabella 6:

Tabella 6 – Distribuzione delle popolazioni campionate in regioni geografiche

Regioni geografiche	Provenienze
Parco del Pollino	<i>Plantago brutia</i>
Svezia	<i>P. media</i> S1 – S2
Alpi	<i>P. media</i> Au – F1 – F2 – F3 – CA – EA – Ga
Appennini	<i>P. media</i> Ab – Em – Tu
Balcani	<i>P. media</i> B1 – B2 – Bul
Spagna	<i>P. media</i> Bu – Na – Sa – As – L1 – L2 – L3

Ciascuna sequenza ottenuta è stata confrontata con quelle depositate in GenBank usando il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) per confermare che la regione analizzata fosse quella di interesse. In caso di ambiguità nella lettura degli elettroferogrammi sono stati utilizzati i simboli universali proposti dalla nomenclatura IUPAC. Gli indels, invece, sono stati indicati da semplici trattini.

Le sequenze sono state dunque allineate usando il metodo Clustal W (Thompson et al.,1994) contenuto nel programma Bio-Edit (Hall T.A., 1999). Il metodo Clustal W è un programma di allineamento multiplo di

sequenze, di scopo generale, che serve per il DNA o le proteine.

Produce allineamenti biologici multipli, significativi per sequenze divergenti e calcola il miglior coordinamento per le sequenze selezionate, mettendo in evidenza identità, similarità e differenze.

Successivamente le sequenze sono state analizzate con il programma DnaSP (ver. 4.50.2) (Rozas et al., 2003), per stimare i polimorfismi.

E' stata analizzata la diversità genetica attraverso l'indice di diversità aplotipica (Hd) (Nei and Tajima, 1983) e poi la divergenza nucleotidica a coppie Pi (Jukes and Cantor, 1969).

Sono stati successivamente analizzati gli aplotipi impiegando il file che considera i gaps come variante nucleotidica al 5° stato, e visualizzati graficamente con il programma TCS (Clement et al., 2000.)

I rapporti filogenetici sono stati invece desunti usando il metodo Neighbor-Joining (NJ) e della Massima Parsimonia, eseguiti con il programma MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Le distanze evolutive sono state computate usando il metodo di Kimura 2 parametri. Per valutare la robustezza relativa dei cladi è stato eseguito il bootstrap con 500 repliche. Per accertare il grado di omoplasia sono stati calcolati i seguenti indici: CI (Consistency index), RI (Retention index). CI e RI esprimono la validità dell'albero in termini statistici calcolando, l'uno il rapporto tra il numero minimo dei possibili cambiamenti evolutivi e la reale lunghezza dell'albero, l'altro la relazione tra l'effettivo numero di cambiamenti di un carattere col massimo numero possibile di cambiamenti. I valori di CI ed RI sono compresi tra zero ed uno e quanto più si ci avvicina al valore unitario, tanto più aumenta la probabilità che i risultati ottenuti rispondano al vero. Le sequenze di ciascun frammento sono state

analizzate dapprima individualmente; poi, sono state unite fra loro per un'analisi combinata. Per eseguire le analisi è stata inoltre effettuata una ricerca in GenBank delle stesse sequenze per altre specie di *Plantago* e per il genere *Veronica*. Quest'ultimo è stato posto come outgroup, poiché considerato da Olmstead e Reeves (1995) e da Olmstead et al. (2001) essere il sister group di *Plantago*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tra i tratti analizzati solo alcuni hanno dato buon esito, alcuni sono risultati più informativi ed altri meno, come il *trnS-trnG* ed il *psbA-trnH*. Diversi tratti non si sono amplificati, altri hanno dato bande multiple, che in seguito a purificazione da gel hanno reso sequenze non leggibili o l'impossibilità di effettuare il sequenziamento (Tab 7).

Tabella 7- s = singola banda, m= banda multipla, na = non amplificato, + = reazione leggibile, - = sequenziamento non eseguito, rf = reazione fallita, nl = non leggibile

Regione	genoma	P. brutia	P.media	Seq
ITS1	nucleare	s	s	+
ITS2	nucleare	s	s	+
ETS	nucleare	m	s	-
MAX4	nucleare	m	s	rf
DIGMAX	nucleare	na	na	-
LEAFY	nucleare	s	na	-
<i>trnL</i>	plastidiale	s	s	+
<i>trnL-trnF</i>	plastidiale	s	s	+
<i>accD-psa1</i>	plastidiale	s	s	+
<i>rps16</i>	plastidiale	m	m	nl
<i>trnS-trnG</i>	plastidiale	s	s	+
<i>rpl16</i>	plastidiale	m	m	-
<i>psbA-trnH</i>	plastidiale	s	s	+
<i>atpB-rbcL</i>	plastidiale	s	s	+
pistillata	plastidiale	s	m	nl
<i>psbk-psbI</i>	plastidiale	s	s	+
JPm3§	microsatellite	m	m	rf
Pm3§	microsatellite	m	m	rf
PII8	microsatellite	m	m	nl
PII10	microsatellite	m	m	nl
PII11	microsatellite	m	m	nl
PII13	microsatellite	m	m	nl

ITS1

L'ITS1 di *P. brutia*, allo stesso modo degli individui di *P. media*, presenta una lunghezza di 223 bp. Dall' allineamento sono emerse 5 differenze (Tab 8). *P. brutia* presenta in posizione 104 una base diversa da tutte le *P. media* [transversione A/T], la base 176 si definisce Y poiché in alcuni individui è una C e in altri una T come in tutti gli individui di *P. media*. La base 36 che è una T, presenta ambiguità in alcuni campioni (Tu, Alpi Apuane; Em, Appennino Bolognese; EA, Alpi Orientali; CA, Alpi Centrali; AU, Austria; F2, Isle d'Abeau) nei quali si presenta sia T che A, e negli elettroferogrammi mostra un doppio picco. Le basi 84 e 177 mostrano una transizione (A/G) che varia da campione a campione, ad eccezione di quelli svedesi che si definiscono V (A o G).

ITS2

L'allineamento delle sequenze dell'ITS2 mostra che in *P. brutia* la lunghezza è di 192 bp, mentre in *P. media* si possono avere lunghezze di 191-192 bp (Tab 9). Sono emerse, anche per questo tratto, 5 differenze. In *P. brutia* si può osservare che le popolazioni presenti nell'area sud occidentale, differiscono dalle popolazioni presenti nell'area centrale del suo areale e dalle altre *P. media*, per una transversione (A/C) in posizione 102. La base 19 è una transizione (T/C), in posizione 75 in *P. media* F3 è presente una transversione (A/C) ed in alcune popolazioni spagnole la base 187 si definisce Y poiché in alcuni individui è una C e in altri una T. A livello della base 28 troviamo, in alcuni individui, la delezione di una T.

Tabella 8- ITS1

	bp	36	84	104	176	177
<i>P. brutia</i>	223	T	A	A	Y	G
<i>P. media</i> Ab	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> Tu	223	W	A	T	T	A
<i>P. media</i> Em	223	W	G	T	T	A
<i>P. media</i> Ga	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> AO	223	W	A	T	T	A
<i>P. media</i> CA	223	W	A	T	T	A
<i>P. media</i> B1	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> B2	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> Au	223	W	A	T	T	A
<i>P. media</i> Bul	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> S1	223	T	V	T	T	V
<i>P. media</i> S2	223	T	V	T	T	V
<i>P. media</i> F1	223	T	G	T	T	G
<i>P. media</i> F2	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> F3	223	W	A	T	T	A
<i>P. media</i> Bu	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> Na	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> Sa	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> As	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> L1	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> L2	223	T	A	T	T	G
<i>P. media</i> L3	223	T	A	T	T	G

W = A o T

Y = T o C

V = A o G

Tabella 9- ITS2

	bp	19	28	75	102	187
<i>P. brutia</i> SO	192	T	T	A	A	C
<i>P. brutia</i> C	192	T	T	A	C	C
<i>P. media</i> Ab	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> Tu	192	C	T	A	C	C
<i>P. media</i> Em	192	T	T	A	C	C
<i>P. media</i> Ga	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> EA	192	C	T	A	C	C
<i>P. media</i> CA	192	C	T	A	C	C
<i>P. media</i> B1	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> B2	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> Au	192	C	T	A	C	C
<i>P. media</i> Bul	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> S1	192	C	T	A	C	C
<i>P. media</i> S2	192	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> F1	191	T	T	A	C	C
<i>P. media</i> F2	192	C	T	C	C	C
<i>P. media</i> F3	192	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> Bu	191	T	-	A	C	C
<i>P. media</i> Na	191	T	-	A	C	Y
<i>P. media</i> Sa	191	T	-	A	C	Y
<i>P. media</i> As	191	T	-	A	C	Y
<i>P. media</i> L1	191	T	-	A	C	Y
<i>P. media</i> L2	191	T	-	A	C	Y
<i>P. media</i> L3	191	T	-	A	C	Y

W = A o T

Y = T o C

V = A o G

Partendo dalle matrici di distanza si sono ottenuti alberi sia per i singoli ITS1, ITS2 che per i due tratti nucleari combinati insieme, i quali hanno mostrato il risultato migliore. Nel dataset finale delle due sequenze ci sono 462 posizioni, delle quali 60 sono informative per la parsimonia. L'albero che segue è uno degli alberi più parsimoniosi dei due tratti considerati insieme. Presenta, a supporto della sua validità, buoni valori di bootstrap, un CI pari a 0.812 ed un RI pari a 0.843.

Da un primo nodo con un buon valore di bootstrap si separa un clade che contiene due specie di *Plantago*, che sono state inserite nelle analisi per aumentare la validità del dato statistico ed un secondo clade dal quale si separano altri 4 cladi.

Si osserva come i due gruppi di *P. brutia* (SO e C) si separano dalle restanti *Plantago* in un clade a se con un valore di bootstrap pari a 100; mentre altri due cladi, con moderati valori di bootstrap (rispettivamente 67 e 55), portano al loro interno popolazioni di diverse provenienze. Infine, le tre provenienze francesi mostrano un andamento particolare in quanto si distribuiscono in tre differenti gruppi.

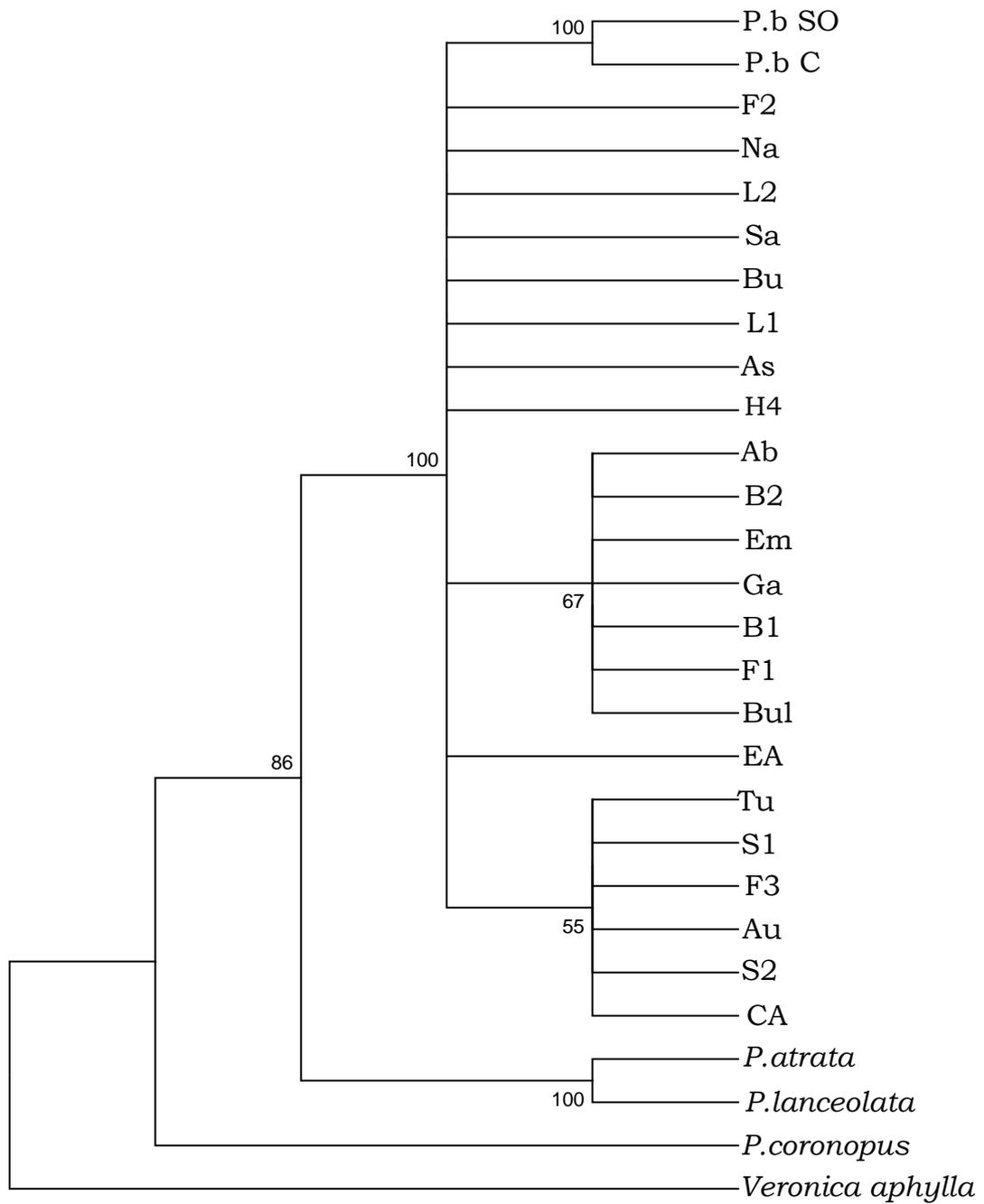


Figura 7 – Albero ITS1 ed ITS 2 combinati

trnL

Il *trnL* di *P. brutia* presenta una lunghezza di 507 bp, mentre quello di *P. media* varia tra 507-510 bp, fatta eccezione per le Alpi Centrali che presentano una delezione di 101 bp. Dall'allineamento effettuato sono emerse 7 differenze, di cui 3 indel ed una transizione (C /T) (Tab 10). L'indice di diversità aplotipica (Hd) è pari allo 0.087 e la divergenza nucleotidica a coppie (Pi) presenta un valore pari allo 0.00021.

Dall'analisi dei polimorfismi sono stati evidenziati 7 aplotipi (Fig). Si osserva che *P. brutia* presenta un aplotipo singolo, che si differenzia da tutti gli altri appartenenti a *P. media*, e che l'aplotipo più frequente è H3 (61%) presente in tutte e 5 le regioni di *P. media* e in particolare al 100% in Svezia e in Spagna (Fig 8).

Tabella 10- *trnL*

		bp	13	42	174-274	358
H1	◆ <i>P. brutia</i>	507	A	-		C
H2	◆ <i>P. media</i> Ab	508	A	A		T
H3	◆ <i>P. media</i> Tu	508	A	A		C
H4	◆ <i>P. media</i> Em	510	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> Ga	508	A	A		C
H5	◆ <i>P. media</i> EA	509	-	A		C
H6	◆ <i>P. media</i> CA	409	A	A	delezione 101basi	C
H3	◆ <i>P. media</i> B1	508	A	A		C
H5	◆ <i>P. media</i> B2	509	-	A		C
H5	◆ <i>P. media</i> Au	509	-	A		C
H7	◆ <i>P. media</i> Bul	507	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> S1	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> S2	508	A	A		C
H4	◆ <i>P. media</i> F1	510	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> F2	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> F3	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> Bu	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> Na	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> Sa	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> As	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> L1	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> L2	508	A	A		C
H3	◆ <i>P. media</i> L3	508	A	A		C

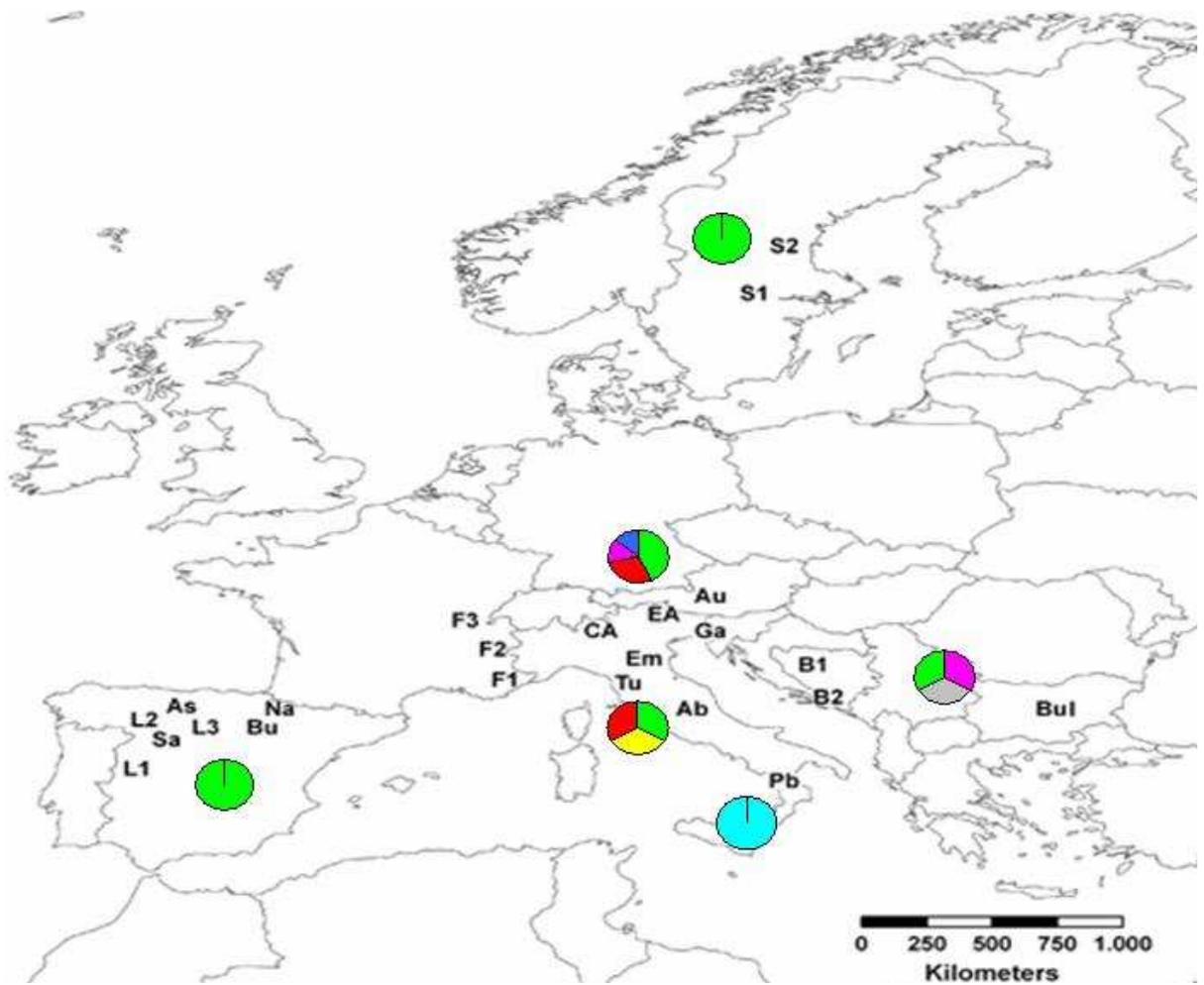


Figura 8 – *trnL*:distribuzione degli aplotipi nelle regioni

trnL-trnF

Il *trnL-trnF* di *P. brutia* presenta una lunghezza di 362 bp, quello di *P. media* varia tra 363-365 bp. Dall' allineamento effettuato sono emerse 8 differenze. Si tratta di 4 indel in stretch di C e T e 4 mutazioni puntiformi (transizioni/transversioni): in posizione 55 (transversione: C/A) nella popolazione Na; in posizione 69 (transizione: C/T) in Bul; in posizione 218 (transizione:G/A) in Bu e Na e infine in posizione 231 (transizione: C/T) in Bu (Tab 11).

L'indice di diversità aplotipica (Hd) è pari allo 0.249 e la divergenza nucleotidica a coppie (Pi) presenta un valore pari allo 0.00118.

Dall'analisi dei polimorfismi sono stati evidenziati 7 aplotipi (Fig 9). Anche per questo marcatore plastidiale, si nota che *P. brutia* presenta un aplotipo singolo che si differenzia da tutti gli altri appartenenti a *P. media*. L'aplotipo più frequente è H2 (48%), è presente in 4 delle 5 regioni di *P. media* essendo assente nei Balcani. In Svezia è presente al 100%.

Tabella 11- *trnL-trnF*

		bp	31	37	55	69	80	218	231	279
H1	◆ P. brutia	362	-	-	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media Ab	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media Tu	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H3	◆ P. media Em	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H4	◆ P. media Ga	364	C	T	C	C	-	G	C	C
H3	◆ P. media EA	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H3	◆ P. media CA	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H4	◆ P. media B1	364	C	T	C	C	-	G	C	C
H3	◆ P. media B2	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H3	◆ P. media Au	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H5	◆ P. media Bul	364	C	T	C	T	T	G	C	-
H2	◆ P. media S1	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media S2	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H3	◆ P. media F1	365	C	T	C	C	T	G	C	C
H2	◆ P. media F2	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media F3	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H6	◆ P. media Bu	363	-	T	C	C	-	A	T	C
H7	◆ P. media Na	363	-	T	A	C	-	A	C	C
H2	◆ P. media Sa	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media As	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media L1	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media L2	363	-	T	C	C	-	G	C	C
H2	◆ P. media L3	363	-	T	C	C	-	G	C	C

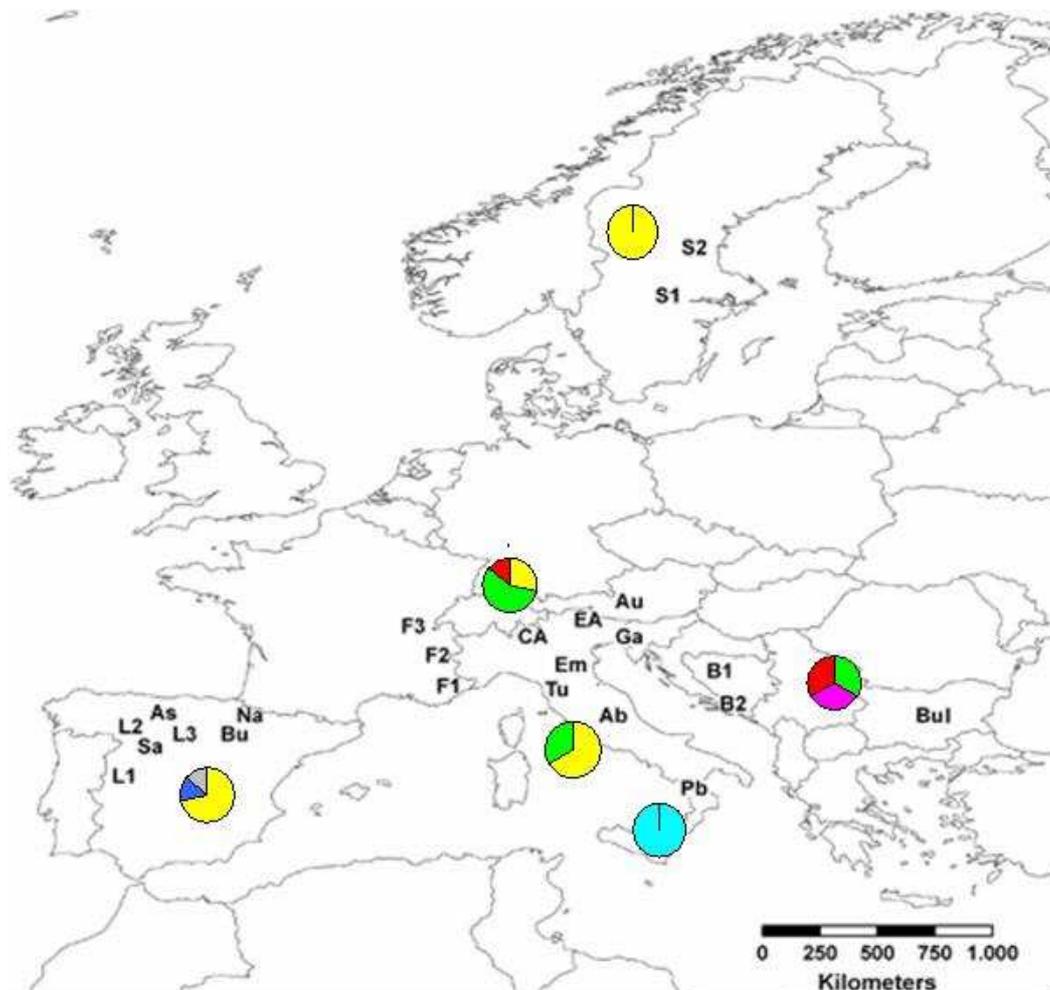


Figura 9 – *trnL-trnF*:distribuzione degli aplotipi nelle regioni

accD-psa1

L'amplificazione e sequenziamento del tratto plastidiale *accD-psa1* ha messo in evidenza lunghezze che variano tra 600 e 619 bp, Dall'allineamento effettuato sono emerse 5 differenze (Tab 12) di cui 3 indel, e due transversioni: una in posizione 291(C/A) ed una in posizione 478 (T/G).

L'indice di diversità aplotipica (Hd) è pari allo 0.170 e la divergenza nucleotidica a coppie (Pi) presenta un valore pari allo 0.00029.

Dall'analisi dei polimorfismi sono stati evidenziati 7 aplotipi (Fig 10).

A differenza di quanto osservato con i tratti finora analizzati, *P. brutia* presenta un aplotipo singolo, ma non più unico. Infatti tale aplotipo (H1) si riscontra anche in 6 delle 7 popolazioni spagnole, in una popolazione alpina e una appenninica. La restante popolazione spagnola (L3) si discosta presentando un aplotipo unico (H7).

Tabella 12 – *accD-psa1*

		bp	291	379	414-431 *	478	574-585
H1 	<i>P. brutia</i>	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> Ab	600	C	-	-	T	8 A
H2 	<i>P. media</i> Tu	619	C	-	+	T	9 A
H3 	<i>P. media</i> Em	604	C	A	-	T	11 A
H1 	<i>P. media</i> Ga	600	C	-	-	T	8 A
H3 	<i>P. media</i> EA	604	C	A	-	T	11 A
H3 	<i>P. media</i> CA	604	C	A	-	T	11 A
H4 	<i>P. media</i> B1	600	C	-	-	G	8 A
H3 	<i>P. media</i> B2	604	C	A	-	T	11 A
H3 	<i>P. media</i> Au	604	C	A	-	T	11 A
H5 	<i>P. media</i> Bul	603	C	-	-	T	11 A
H6 	<i>P. media</i> S1	618	C	-	+	T	8 A
H6 	<i>P. media</i> S2	618	C	-	+	T	8 A
H3 	<i>P. media</i> F1	604	C	A	-	T	11 A
H6 	<i>P. media</i> F2	618	C	-	+	T	8 A
H6 	<i>P. media</i> F3	618	C	-	+	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> Bu	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> Na	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> Sa	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> As	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> L1	600	C	-	-	T	8 A
H1 	<i>P. media</i> L2	600	C	-	-	T	8 A
H7 	<i>P. media</i> L3	600	A	-	-	T	8 A

delezione di 18 basi * CAAGAAATTTAGAACTAA

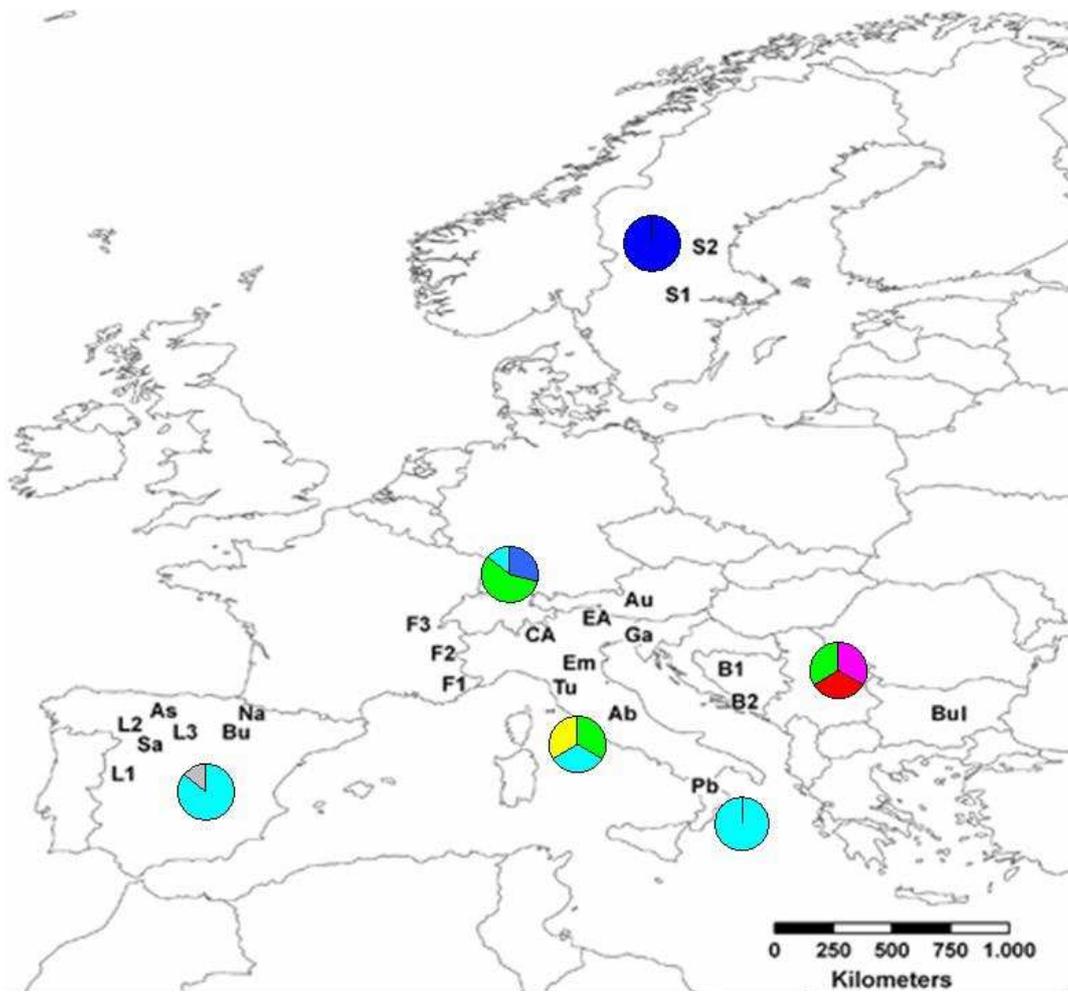


Figura 10 – *accD-psa1*:distribuzione degli aplotipi nelle regioni

atpB-rbcL

L'amplificazione e sequenziamento del tratto plastidiale *atpB-rbcL* ha rivelato tratti che variano tra 598 e 610 bp. Dall'allineamento effettuato sono emerse 4 differenze di cui 3 indel ed una transversione (G/T)(Tab.13).

L'indice di diversità aplotipica (Hd) è pari allo 0.166 e la divergenza nucleotidica a coppie (Pi) presenta un valore pari allo 0.00028.

Dall'analisi dei polimorfismi sono stati evidenziati 5 aplotipi (Fig.11).

Anche per questo tratto, *P. brutia* presenta un aplotipo singolo, ma non più unico. Infatti tale aplotipo (H1) è presente in tutte le regioni di *P. media* in diverse proporzioni e in particolare in Svezia al 100%.

Tabella 13 – *atpB-rbcL*

		bp	277	298-305 *	386	543-546 **
H1 ◆	<i>P. brutia</i>	602	T	-	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> Ab	602	T	-	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> Tu	602	T	-	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> Em	610	T	+	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> Ga	602	T	-	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> EA	610	T	+	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> CA	610	T	+	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> B1	602	T	-	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> B2	610	T	+	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> Au	610	T	+	G	+
H3 ◆	<i>P. media</i> Bul	609	-	+	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> S1	602	T	-	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> S2	602	T	-	G	+
H2 ◆	<i>P. media</i> F1	610	T	+	G	+
H4 ◆	<i>P. media</i> F2	602	T	-	T	+
H1 ◆	<i>P. media</i> F3	602	T	-	G	+
H5 ◆	<i>P. media</i> Bu	598	T	-	G	-
H5 ◆	<i>P. media</i> Na	598	T	-	G	-
H1 ◆	<i>P. media</i> Sa	602	T	-	G	+
H4 ◆	<i>P. media</i> As	602	T	-	T	+
H1 ◆	<i>P. media</i> L1	602	T	-	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> L2	602	T	-	G	+
H1 ◆	<i>P. media</i> L3	602	T	-	G	+

*TTTTCCTA ; **CATT

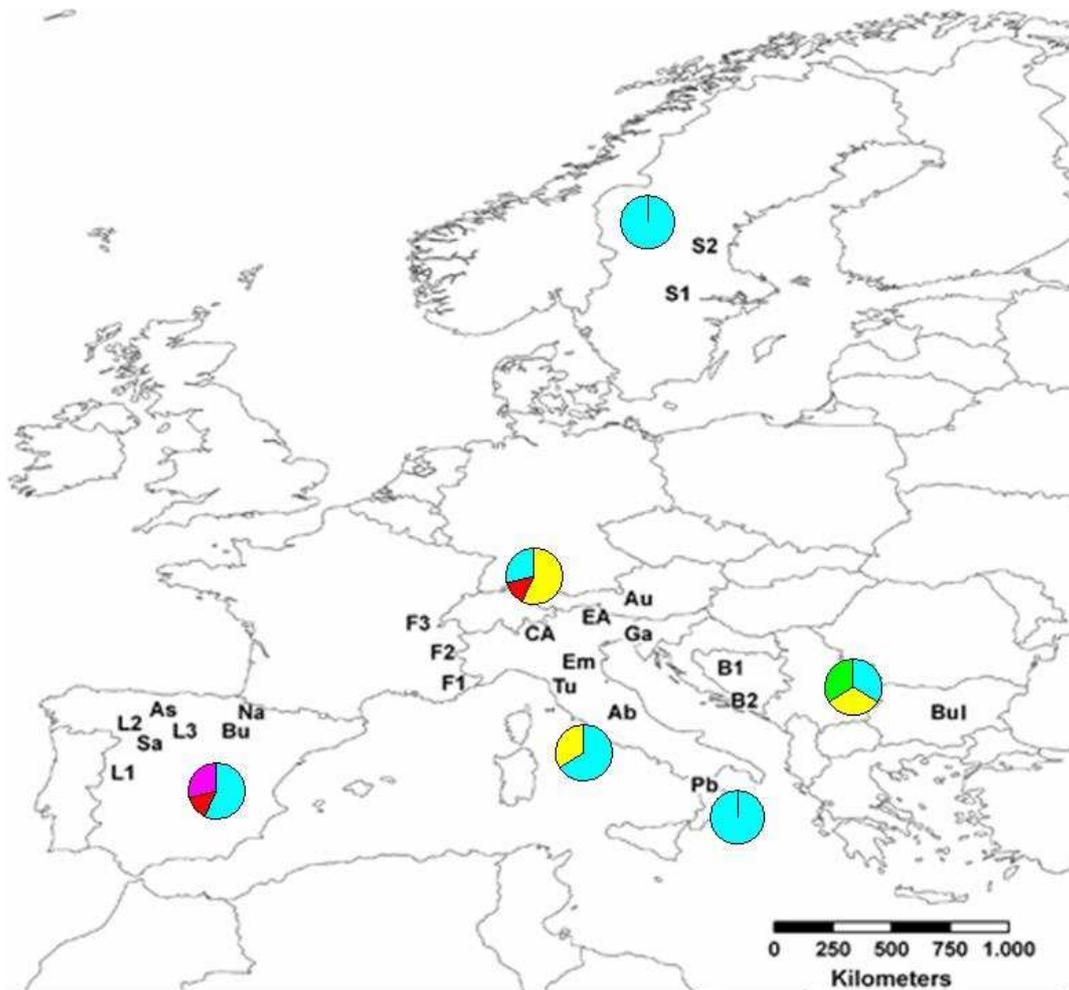


Figura 11 – *atpB-rbcL*:distribuzione degli aplotipi nelle regioni

Analisi combinata nucleare-plastidiale

L'assenza di ricombinazione nel genoma plastidiale ha indotto molti ricercatori ad indagare il polimorfismo a diversi loci plastidiali ed a combinare gli aplotipi trovati singolarmente a ciascun locus in un unico aplotipo globale, per ciascun individuo o popolazione (Grivet & Petit 2002; Alsos et al. 2005). Questo approccio è supportato dalla robustezza maggiore a livello di bootstrap, che generalmente si raggiunge quando una porzione più grande del genoma è inclusa nelle analisi statistiche (Hillis et al. 1996). Per questo motivo, nell'analisi dei dati, sono state combinate le sequenze dei tratti nucleari (ITS1-ITS2) e dei tratti plastidiali (*trnL*; *trnL-trnF*; *accD-psa1*; *atpB-rbcL*).

Nel dataset finale delle sequenze ci sono 2661 posizioni, delle quali 142 sono informative per la parsimonia.

L'albero che segue è uno dei 198 alberi più parsimoniosi, che presenta, a supporto della sua validità, ottimi valori di bootstrap; un CI pari a 0.84 ed un RI pari a 0.86.

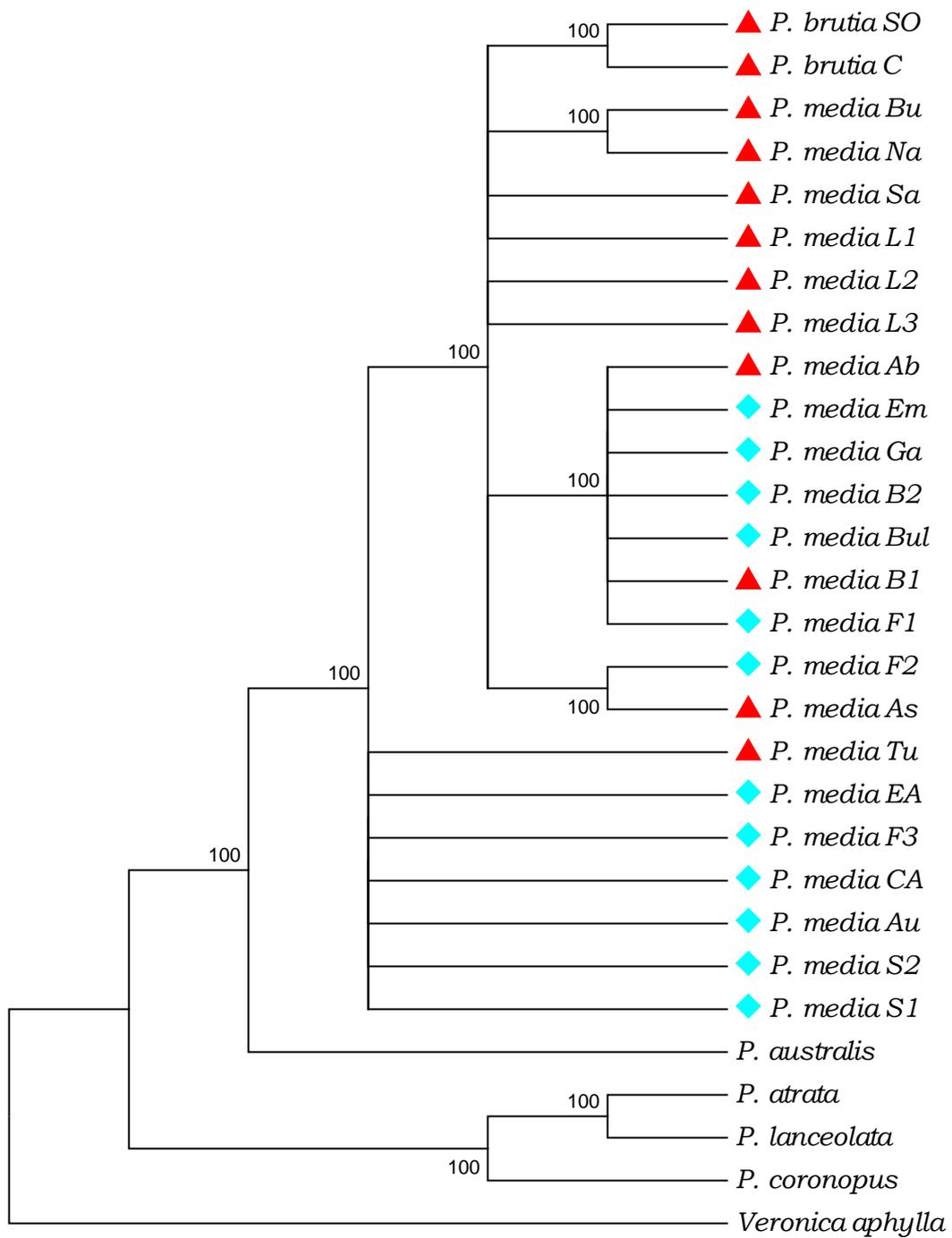


Figura 12 – Albero nrDNA e cpDNA combinati

Per l'analisi combinata dei polimorfismi, sono stati tolti i tratti nucleari, e si sono ottenuti 16 diversi aplotipi (Tab.14), di cui solo 4 condivisi fra alcune popolazioni. Il network mostra come aplotipo ancestrale H14 che racchiude 3 (Sa, L1, L2) delle 7 popolazioni spagnole (Fig. 13).

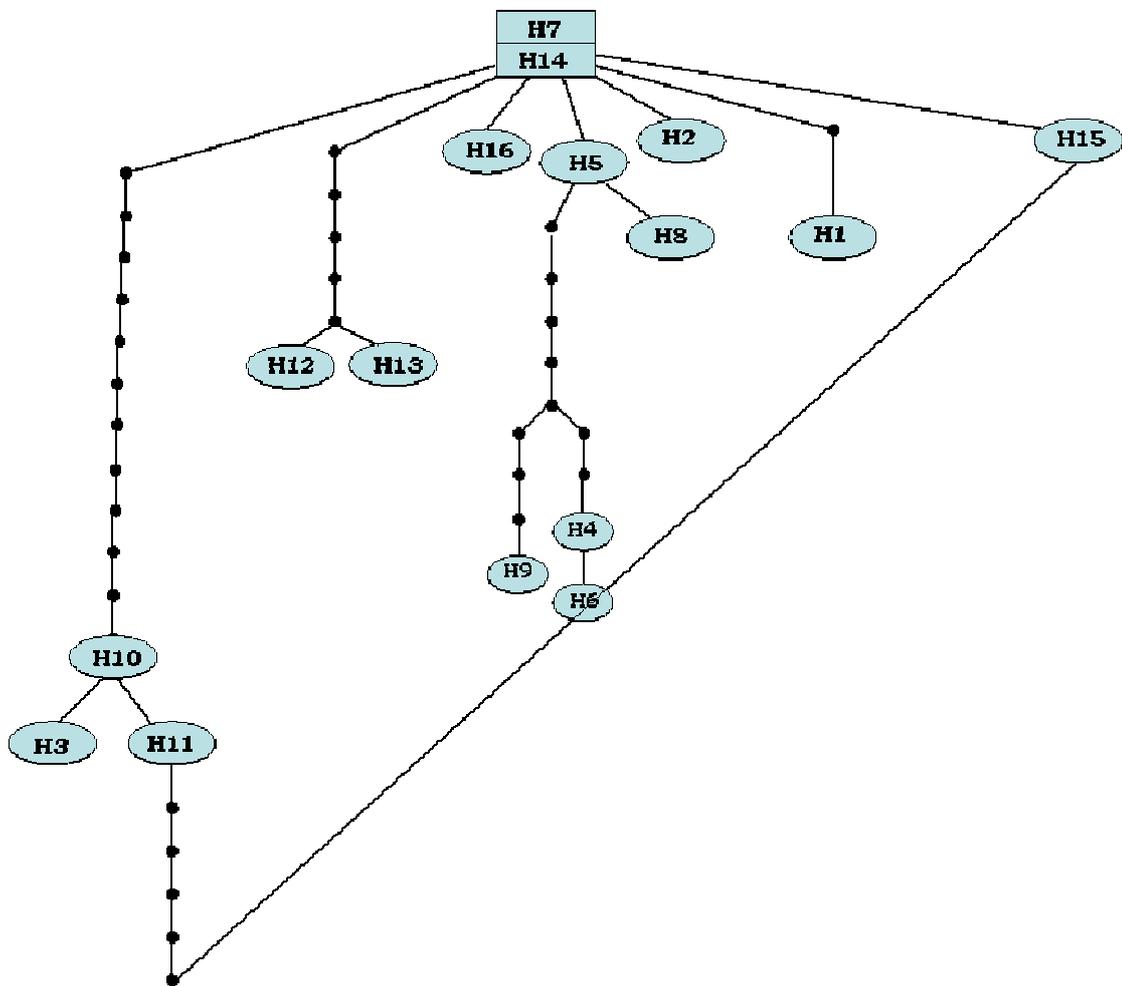


Figura 13 – Network cpDNA combinati

Tabella 14 - Aplotipi dall'analisi combinata dei cpDNA

H1	<i>P.brutia</i>
H2	<i>P.media</i> Ab
H3	<i>P.media</i> Tu
H4	<i>P.media</i> Em, F1
H	<i>P.media</i> Ga
H6	<i>P.media</i> EA, B2, Au
H7	<i>P.media</i> CA
H8	<i>P.media</i> B1
H9	<i>P.media</i> Bul
H10	<i>P.media</i> S1
H11	<i>P.media</i> F2
H12	<i>P.media</i> Bu
H13	<i>P.media</i> Na
H14	<i>P.media</i> Sa, L1, L2
H15	<i>P.media</i> As
H16	<i>P.media</i> L3

psbK-psbI

L'amplificazione e sequenziamento del tratto plastidiale *psbk-psbI* ha messo in evidenza lunghezze che variano tra 342 e 364 bp. Per questo tratto sono state eseguite analisi random in individui di tutte le popolazioni di *P. brutia*. Tali popolazioni hanno mostrato differenze apprezzabili tra all'interno delle due aree geografiche di insediamento. Dall'allineamento effettuato sono emerse 3 differenze, di cui 2 indel ed 1 transizione : una delezione di 20 basi in posizione 91 ed una in uno stretch di T, ed una transizione in posizione 249 (G/A) (Tab.15)..

L'indice di diversità aplo-tipica (Hd) è pari allo 0,198 e la divergenza nucleotidica a coppie (Pi) presenta un valore pari allo 0.00058.

Dall'analisi dei polimorfismi sono stati evidenziati 9 aplotipi (Fig. 14), di questi tre (H1, H2, H3) sono unici delle popolazioni di *P. brutia* che si insediano nella regione sud occidentale del Parco Nazionale del Pollino e tre (H7, H8, H9) sono unici di alcune popolazioni di *P. media*. I restanti tre (H4, H5, H6) sono condivisi tra le popolazioni di *P. brutia* dell'area centrale del Parco e di altre popolazioni di *P. media*.

Un'analisi effettuata col Neighbor-Joining supporta chiaramente la distribuzione degli aplotipi, infatti quelli unici di *P. brutia* (H1-H2-H3) costituiscono un clade a se supportato da discreti valori di bootstrap (Fig.14).

Tabella 15 – *psbK-psbI*

		bp	91-110 *	249	327-338
H1	◆ P. brutia SOa	362	+	A	9 T
H2	◆ P. brutia SOb	363	+	A	10 T
H3	◆ P. brutia SOc	364	+	A	11 T
H4	◆ P. brutia Ca	362	+	G	9 T
H5	◆ P. brutia Cb	363	+	G	10 T
H6	◆ P. brutia Cc	364	+	G	11 T
H5	◆ P. media Ab	363	+	G	10 T
H6	◆ P. media Tu	364	+	G	11 T
H7	◆ P. media Em	343	-	G	10 T
H4	◆ P. media Ga	362	+	G	9 T
H7	◆ P. media EA	343	-	G	10 T
H7	◆ P. media CA	343	-	G	10 T
H5	◆ P. media B1	362	+	G	10 T
H7	◆ P. media B2	343	-	G	10 T
H7	◆ P. media Au	343	-	G	10 T
H8	◆ P. media Bul	342	-	G	9 T
H9	◆ P. media S1	365	+	G	12 T
H9	◆ P. media S2	365	+	G	12 T
H7	◆ P. media F1	343	-	G	10 T
H6	◆ P. media F2	364	+	G	11 T
H6	◆ P. media F3	364	+	G	11 T
H9	◆ P. media Bu	365	+	G	12 T
H5	◆ P. media Na	363	+	G	10 T
H4	◆ P. media Sa	362	+	G	9 T
H4	◆ P. media As	362	+	G	9 T
H4	◆ P. media L1	362	+	G	9 T
H4	◆ P. media L2	362	+	G	9 T
H4	◆ P. media L3	362	+	G	9 T

delezione di 20 basi : ATAAGATAGTCTGAACCTTA

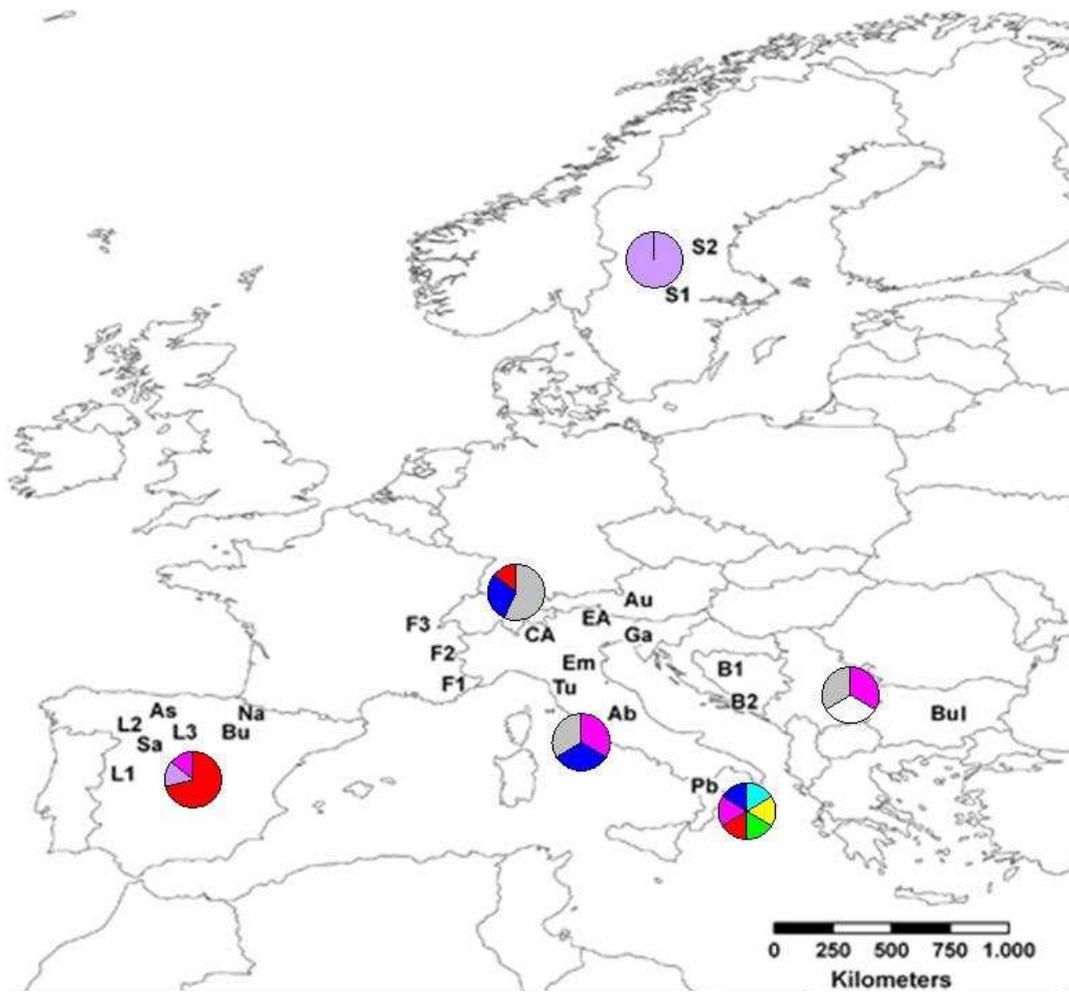


Figura 14 – *psbK-psbI*:distribuzione degli aplotipi nelle regioni

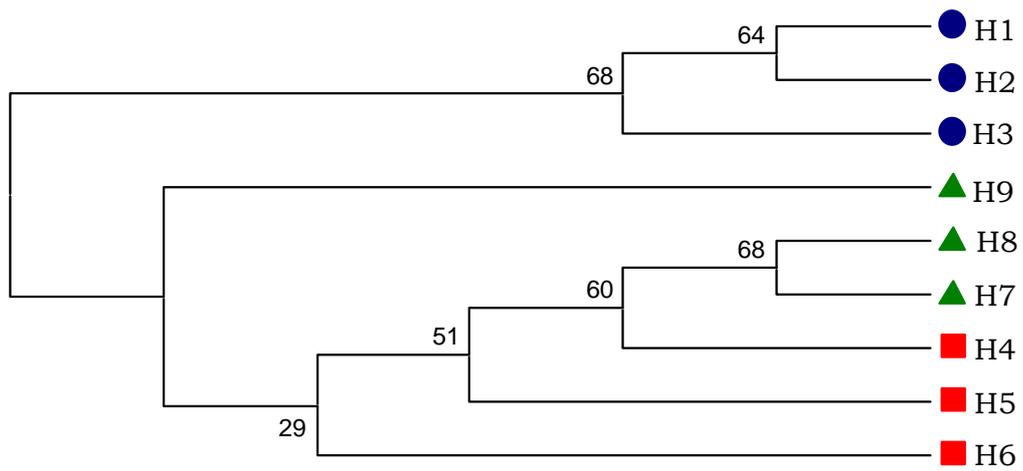


Figura 15 – Albero NJ *psbK-psbI*

CONCLUSIONI

I dati ottenuti con l'ITS mostrano chiaramente che *P. brutia* rientra nella linea evolutiva di *P. media*; però, giacchè presenta differenze a livello di sequenze da tutte le *P. media*, forma un clade a se supportato da un ottimo valore di bootstrap. Lo stesso è confermato dalla presenza di due aplotipi unici in *P. brutia*, evidenziatisi attraverso l'analisi dei tratti plastidiali *trnL* e *trnL-trnF*. Se però consideriamo gli altri tratti plastidiali (*accD-psaI* e *atpB-rbcL*), *P. brutia* condivide lo stesso aplotipo con alcune popolazioni di *P. media* provenienti da aree diverse.

Ciò dimostra ulteriormente la stretta affinità tra *P. brutia* e *P. media*.

Di conseguenza, lo studio molecolare condotto dimostra che il miglior trattamento tassonomico per *P. brutia* dovrebbe essere del rango di sottospecie di *P. media*, come era stato suggerito da Arcangeli (1882) e poi sostenuto da Greuter et al. (1986) e Conti et al. (2005). Infatti, l'analisi combinata delle prove nrDNA e cpDNA evidenzia per *P. brutia* un ben distinto lineage sempre all'interno di *P. media*. Da un primo nodo si separa un clade che raggruppa al suo interno i campioni della Svezia, delle Alpi centrali, orientali e nord-occidentali e delle Alpi Apuane, che pare si riferiscano quasi certamente a *P. media* subsp. *media* (descritta da Linneo (1753), per "Europae pascuis sterilibus apricis argillosis"). Questo clade, secondo van Dijk et al. (1992) dovrebbe includere solo autotetraploidi, con l'eccezione delle popolazioni delle Alpi Apuane, che vengono segnalate come diploidi (Giordani et al., 1980).

Da un secondo nodo si separano poi altri 5 cladi che sono statisticamente ben sostenuti.

Due di essi includono le popolazioni provenienti dalla Spagna (Bu ed Na uno, l'altro Sa, L1, L2 ed L3), un terzo due popolazioni europee occidentali (uno dalla Spagna ed uno dalla Francia, rispettivamente diploide e tetraploide, secondo van Dijk et al.(1992). I rimanenti due cladi, anch'essi con un buon supporto statistico, includono uno le due regioni di *P. brutia*, e l'altro piante da diverse aree europee, sia diploidi con $2n = 12$ cromosomi (ad esempio B1, (Aquaro et al., 2007)) che tetraploidi con $2n = 24$ cromosomi (ad esempio B2, (Aquaro et al., 2007)).

Secondo i dati citogeografici presentati da van Dijk et al. (1992), tutte le popolazioni campionate in Spagna dovrebbero essere diploidi e potrebbero riferirsi a *P. media* subsp. *nevadensis*, una unità non riconosciuta nella più recente flora spagnola (Pedrol, 2008).

Il clade che unisce i campioni dai Balcani, nord-est Italia e l'Abruzzo potrebbe far riferimento sia a *P. media* subsp. *indica* (descritto per il nord della Grecia) o *P. media* subsp. *stepposa* (descritto per l'Ungheria) in accordo con Greuter et al. (1986). I nostri dati suggeriscono, tuttavia, un valore dubbio sul fatto che queste unità possono essere unite.

In questo studio si evidenzia anche l'urgente necessità di studi tassonomici e citogeografici più approfonditi tra i cinque (oltre la subsp. *brutia*) lineage infraspecifici evidenziati in *P. media*. Infatti, questa specie mostra una notevole eterogeneità molecolare, oltre che cariologica e morfologica. Infine, i nostri dati suggeriscono che le presenti popolazioni di *P. media* sensu lato potrebbero avere avuto la loro origine nella penisola iberica, come rifugio primario, e poi si sarebbero diffuse in tutta Europa, mostrando certamente una zona secondaria di rifugio nel sud d'Italia, dove *P. media* subsp. *brutia* si

sarebbe differenziata.

Questo dato è anche supportato dall'analisi filogenetica condotta con il TCS nella quale si evidenziava come proprio l'aplotipo ancestrale era spagnolo (Fig.13).

L'autopoliploidia in *P. media* sembra essersi verificata in almeno tre diversi momenti e aree: Penisola Iberica, Italia centrale e Balcani, anche se non in tutti i casi sono derivati lineage distinti.

Infatti, *P. media* subsp. *brutia* appartiene ad una stirpe di diploidi che non sembrano avere originato varietà tetraploide, nonostante sia una sottospecie in continua evoluzione, come dimostrato dalle indagini molecolari condotte con il tratto *psbK-psbI*. Queste indagini vanno a confermare i risultati ottenuti in un lavoro precedente con gli ISSR all'interno delle popolazioni di questo lineage, De Vita et al., 2009), che mostravano un flusso genico non trascurabile.

Le specie di *Plantago* europee sono caratterizzate da auto-incompatibilità, protoginia e ginodioecia (Van Damme 1986). In particolare, *P. media* sembra essere tipicamente protogina (Sagar & Harper 1964), ma le sue discendenze diploidi sono auto-incompatibili, mentre i tetraploidi mostrano auto-compatibilità (Rønsted et al., 2002). Quindi, l'auto-incompatibilità che si trova in *P. brutia* può essere correlata alla sua affinità per i lineage diploidi di *P. media*.

Da quanto esposto *P. brutia* risulta una delle migliori unità sottospecifiche all'interno di *P. media*.

L'alternanza di periodi glaciali e interglaciali nel periodo plio-pleistocenico sembrano avere giocato un ruolo di preminenza nell'evoluzione di questa specie, così come i rifugi glaciali lungo le tre

principali penisole europee. Questo scenario è coerente con i risultati di Rønsted et al. (2002), secondo i quali *P. media* si sarebbe originata non molto più tardi di 2,5-3 Mya.

Bibliografia

- Andrzejewska-Golec E. (1997). Taxonomic aspects of iridoid glucosides occurring in the genus *Plantago* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*; 66:201-205.
- Alm T., Alsos I.G., Brathen K.A. (1997). Dunkjempe, *Plantago media*, pa Masoya I Finnmark – ny nordgrense. *Blyttia*; 55: 39-44.
- Alsos I.G., Engelskjøn T., Gielly L., Taberlet P., Brochmann C. (2005). Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Molecular Ecology*, 14, 2739–2753.
- Álvarez I., Wendel J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 29: 417–434.
- Aquaro G., Peruzzi L, Cesca G. (2007). Chromosome numbers of 20 flowering plants from ex-Yugoslav countries. *Bocconea*; 21:303-312.
- Arcangeli G. (1882). *Compendio della flora italiana*. Torino.
- Baldwin B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 1:3-16.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S. and Donoghue M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden*; 82:247–277.
- Blázquez M. A., Soowal L.N., Lee I., Weigel D. (1997). LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*; 124:3835-3844.
- Chase M., Soltis D., Olmstead R., and 39 additional authors, (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of Missouri Botanical Garden*; 80:528-80.

Chiang T.Y., Schaal B.A., Peng T. (1998). Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between *atpB* and *rbcl* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*; 39, 245-250.

Clegg M.T., Gaut B.S., Learn jr J.H., Morton B.R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 91: 6795-6801.

Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*; 9 (10): 1657-1660.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C. (Eds.) (2005). An annotated checklist of the Italian vascular flora. Palombi Editori, Roma.

De Vita A., Bernardo L., Gargano D., Palermo A.M., Peruzzi L., Musacchio A. (2009). Investigating genetic diversity and habitat dynamics in *Plantago brutia* (Plantaginaceae), implications for the management of narrow endemics in Mediterranean mountain pastures. *Plant Biology*; 11:821-828.

Dhar M.K., Friebe B., Kaul S., Gill B.S. (2006). Characterization and Physical Mapping of Ribosomal RNA Gene Families in *Plantago*. *Annals of Botany*; 97(4):541-548.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1991). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*; 1:13-15.

Gatenby A.A., Rothstein S.J., Nomura M. (1989). Transnational coupling of the maize chloroplast *atpB* and *atpE* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*; 86:4066-4070.

Giordani A., Miceli P., Monti G. (1980). Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 787-793. *Informatore botanico italiano*; 12:327-332.

Goto K., Meyerowitz M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes & Development*; 8: 1548-1560.

- Greuter W., Burdet H.M. (1982). In:Greuter W., Raus T. (eds.), Med-Checklist notulae 6. Willdenowia 12:183-199.
- Greuter W., Burdet H.M., Long G. (eds.) (1986). Med-Checklist 4:301-302. Genève & Berlin.
- Grivet D., Petit R.J. (2002) Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*; 11, 1351–1362.
- Hale M. L., Wolff C. (2003). Polymorphic microsatellite loci in *Plantago lanceolata*. *Molecular Ecology Notes*; 134-135.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41: 95-98.
- Hamilton M.B. (1999). Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*; 8:513–525.
- Hillis D.N., Moritz C., Mable B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hodges S.A., Arnold M.L. (1994). Columbines: a geographically widespread species flock. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*; 91:5129-5132.
- Jordan W.C., Courtney M.W., Neigel J.E. (1996). Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany*; 83: 430–439.
- Jukes T.H., Cantor C.R., (1969) Evolution of protein molecules, pp. 21–32 in *Mammalian Protein Metabolism*, edited by H. N. MUNRO. Academic Press, New York.
- Kelly L.J., Culham A. (2008). Phylogenetic utility of *MORE AXILLARY GROWTH4* (*MAX4*)-like genes: a case study in *Digitalis* / *Isoplexis* (Plantaginaceae). *Plant Systematics and Evolution*; 27:133-149.

Lahaye R., savolainen V., Duthoit S., Maurin O. , van der bank M. (2008). A test of psbK-psbI and atpF-atpH as potential plant DANN barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa). *Nature Preceding*; 1-21.

Morgan D.R. (2003). nrDNA external transcribed spacer (ETS) sequence data, reticulate evolution, and the systematics of *Machaeranthera* (Asteraceae). *Systematic Botany*; 28:179-190.

Mort M.E., Archibald J.K., Randle C.P., Levens N.D., O'Leary T.R., Topalov K., Wiegand C.M., Crawford D.J. (2007). Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *American Journal of Botany*; 94(2):173-183.

Nei M., Tajima F. (1983). Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics*; 105:207-217.

Nilsson E., Ågren J. (2006). Population size, female fecundity, and sex ratio variation in gynodioecious *Plantago maritima*. *Journal of Evolutionary Biology*; 19:825-833.

Nilsson E., Gyllenstrand N, Wolff K. (2006). Six polymorphic microsatellite markers for *Plantago maritima*. *Molecular Ecology Notes*; 6: 1093-1095.

Olmstead R.G., Palmer J.D. (1994). Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*; 1205-1224.

Olmstead R. G., Sweere J. A. (1994). Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology*; 43: 467-481

Olmstead R.G., Reeves P.A. (1995). Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden*; 82: 176-193.

Olmstead R.G., dePamphilis C.W., Wolfe A.D., Young N.D., Elisons W.J., Reeves P.A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*; 88: 348–361.

Oxelman B., Lidèn M., Berglung D. (1997). Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Silenae (Carophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*; 206:393-410.

Palmer, J.D., Adams K.L., Cho Y., Parkinson C.L., QIU Y.L. et al., (2000). Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 97:6960–6966. [

Pedrol J. (2008). *Plantago* L. in: Castroviejo & al. (eds.), *Flora iberica* vol. 13, <http://www.rjb.csic.es/floraiberica/>, [accessed 28 May 2008]

Peruzzi L, Gargano D. (2006). Biosystematic aspects and distribution of *Plantago brutia* Ten. (Plantaginaceae), an endemic unit of Southern Italy. *Archivio Geobotanico*; 8(1-2):35-48.

Pignatti S. (1982). *Flora d'Italia* 2:627-637. Edagricole, Bologna.

Pilger R. (1937). *Plantago*. In: Engler HGA., *Das Pflanzenreich*; 102:277-281. Berlin.

Powell W., Machray G.C., Provan J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Elsevier Science; vol. 1, n° 7.

Quandt D., Müller K., Stech M., Frahm J.P., Frey W., Hilu K.W., Borsch T. (2004). Molecular evolution of the chloroplast *trnL.F* region in land plants. *Monogram Systematic Botany. Missouri Botanic Garden*; 98:13-37.

Rahn K. (1996). A phylogenetic study of the *Plantaginaceae*. *Botanical journal of the Linnean Society*; 145-198.

Rønsted N., Göbel E., Franzyk H., Jensen S.R., Olsen C.E. (2000). Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glucosides. *Phytochemistry*; 55:337-348.

Rønsted N., Chase M.W., Albach D.C., Bello M.A. (2002). Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid *trnL-F* sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*; 139:323–338.

Rønsted N., Franzyk H., Mølgaard P., Jaroszewski J.W., Jensen S.R. (2003). Chemotaxonomy and evolution in *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*; 242:63-82.

Rozas J., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer X. and Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*; 19:2496-2497.

Sagar G., Harper J.L. (1964). Biological flora of the British Isles. *Plantago major* L., *Plantago media* L., *Plantago lanceolata* L. *Journal of Ecology*; 52:189-221.

Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*; 84:1120-1136.

Sang-Hun O., Potter D. (2003). Phylogenetic utility of the second intron of *LEAFY* in *Neillia* and *Stephanandra* (Rosaceae) and implications for the origin of *Stephanandra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 29:203-215.

Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III.- *American Journal of Botany*, 94(3):275-288.

Small R.L., Ryburn J.A., Cronn R.C., Seelanana T., Wendel J.F. (1998). The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany*; 85:1301–1315.

Squirrell J., Wolff K. (2001). Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Plantago major* and *P. intermedia*. *Molecular Ecology Notes*; 1:179-181.

Steel K.P., Vilgalys R. (1994). Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*. *Systematic Botany*; 19:126–142.

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991). Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*; 17:1105-1109.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*; 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*; 22 (22):4673-4680.

van Damme J.M.M.(1986). Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. V. Frequencies and spatial distribution of nuclear and cytoplasmic genes. *Heredity*; 56: 355–364.

Van Dijk P.J., Bakx-Schotman J.T.M. (1997). Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid *Plantago media*. *Molecular Ecology*; 6:345-352.

van Dijk P.J., Hartog M., Van Delden W. (1992). Single cytotype areas in autopolyploid *Plantago media* L. *Biological Journal of the Linnean Society*; 46(4):315-331.

Wojciechowski M.F., Sanderson M.J., Baldwin B.G., Donoghue M.J. (1993). Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany*; 80:711-722.

Wolff K. (1987). Genetic analysis of ecologically relevant morphological variability in *Plantago lanceolata* L. II. Localisation and organisation of quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics*; 73:903-914.

Wolff K. (1991). Analysis of allozyme variability in three *Plantago* species and a comparison to morphological variability. *Theoretical and Applied Genetics*; 81: 119-126.

Wolff K., Schaal B. (1992). Chloroplast DNA variation within and among five *Plantago* species. *Journal of Evolutionary Biology*; 5: 325-344.

Zemskova E.A. (1977). Karyological study of some species of *Plantago* L. (Plantaginaceae). *Bot Zhurn*; 62(9):1301-1305.