

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze ambientali: Tutela e Gestione delle Risorse Naturali

Ciclo XXII

BIO/03 Botanica ambientale e applicata

Il genere *Rhododendron* L.: diversità genetica e fenomeni di ibridazione.

Presentata da: **Ilaria Bruni**

Coordinatore Dottorato

Prof. ssa Elena Fabbri

Relatore

Prof. Carlo Ferrari

Esame finale anno 2010

INDICE

INTRODUZIONE	5
Capitolo 1 – <u>Scopi del lavoro</u>	6
1.1 Obiettivo I: caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di <i>Rhododendron ferrugineum</i> L.	
1.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di <i>Rhododendron x intermedium</i> Tausch	
Capitolo 2 – <u>Flora Alpina: un deposito di specie rare</u>	8
2.1 Tipi di rarità	
2.1.1 Lararità periferica: sua importanza biologica	
2.1.2 Principali caratteristiche delle popolazioni periferiche	
2.2 Le orofite alpine nelle catene montuose sud-europee	
2.3 Il problema dei cambiamenti climatici	
2.4 L'importanza della copertura nevosa	
2.5 Strategie di conservazione e progetti correlati	
RHODODENDRON	25
Capitolo 3 – <u>Il genere <i>Rhododendron</i> L. nella flora europea</u>	26
3.1 <i>Rhododendron ferrugineum</i>	
3.2 <i>Rhododendron hirsutum</i>	
3.3 <i>Rhododendron x intermedium</i>	
Capitolo 4 – <u>Il fenomeno dell'ibridazione</u>	36

GLI STRUMENTI D'INDAGINE	39
Capitolo 5 – <u>I marcatori molecolari</u>	40
5.1 I marcatori molecolari microsatelliti (SSR)	
5.2 I marcatori filogenetici	
MATERIALI E METODI	48
Capitolo 6 – <u>Campionamenti</u>	49
6.1 Raccolta e conservazione dei campioni	
6.2 Popolazioni campionate	
Capitolo 7 – <u>Analisi molecolari</u>	54
7.1 Estrazione del DNA	
7.2 Visualizzazione e quantificazione del DNA	
7.3 Marcatori molecolari applicati	
7.3.1 Marcatori microsatelliti	
7.3.2 Marcatori filogenetici	
RISULTATI	65
Capitolo 8 – <u>Risultati</u>	66
8.1 Obiettivo I: caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di <i>Rhododendron ferrugineum</i> L	
8.1.1 Confronto tra le popolazioni Appenniniche e Alpine	
8.1.2 Variabilità genetica di <i>Rhododendron ferrugineum</i> nell'intero areale	
8.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di <i>Rhododendron</i> x <i>intermedium</i> Tausch	
8.2.1 Identificazione molecolare delle specie di <i>Rhododendron</i>	
8.2.2 Analisi degli sciami ibridi	

8.2.3 Variabilità genetica delle popolazioni di *Rhododendron x intermedium*

CONCLUSIONI	89
Capitolo 9 – <u>Conclusioni</u>	90
9.1 Obiettivo I: caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di <i>Rhododendron ferrugineum</i> L	
9.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di <i>Rhododendron x intermedium</i> Tausch	
BIBLIOGRAFIA	95
ALLEGATI	108

Introduzione

Capitolo 1

Scopi del lavoro

Le ricerche descritte in questo elaborato riguardano – utilizzando i casi studio di *Rhododendron ferrugineum* L. e dell'ibrido con *R. hirsutum* L. (*Rhododendron x intermedium* Tausch) - due fenomeni di rilevante importanza ai fini della conservazione biologica:

- 1) la variabilità genetica di popolazioni di piccole dimensioni, disgiunte dalla distribuzione geografica principale della specie e in condizioni di marginalità geografica,
- 2) il valore adattativo di ibridi naturali e i flussi genici esistenti con le popolazioni parentali.

Entrambi i fenomeni costituiscono temi centrali nello studio della diversità genetica delle popolazioni naturali e per l'elaborazione di strategie di conservazione.

1.1 Obiettivo I: Caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di *Rhododendron ferrugineum* L.

Ci si è proposti di analizzare la variabilità genetica delle popolazioni di *Rhododendron ferrugineum* L. nel suo areale, con particolare attenzione alle aree marginali dell'Appennino, dove la specie rappresenta un caso di pseudo-rarità, al fine di valutare la diversità genetica di queste popolazioni periferiche e valutare appropriati interventi di conservazione o reintroduzione.. I campionamenti sono stati effettuati nelle uniche 3 stazioni presenti sugli Appennini. Al fine di confrontare la struttura genetica di queste popolazioni sono state considerate anche popolazioni delle Alpi Marittime, delle Alpi centro-orientali e dei Pirenei.

Al fine di valutare l'importanza di queste popolazioni nell'ambito della diversità infraspecifica di *Rhododendron ferrugineum* e consentire la migliore strategia di conservazione, è cruciale conoscere se vi siano differenze importanti tra le popolazioni dell'areale per poter eventualmente selezionare opportunamente gli individui da moltiplicare per interventi di reintroduzione. I protocolli per i rafforzamenti e le reintroduzioni suggeriscono infatti di considerare tra i diversi fattori anche la diversità genetica delle popolazioni originarie al fine di non alterarla.

Questo lavoro aveva anche lo scopo, attraverso l'analisi genetica di tali popolazioni relitte e del loro rapporto con le altre popolazioni nell'areale di distribuzione, di fornire alcune indicazioni per azioni di conservazione. In base ai dati rilevati è stato possibile valutare se le popolazioni delle altre zone

considerate (Alpi Marittime, Alpi centro-orientali e Pirenei) presentano caratteri genetici affini alle popolazioni relitte dell'Appennino; queste informazioni sono utilizzabili per pianificare idonei interventi di conservazione *in situ* o *ex situ*.

1.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di *Rhododendron x intermedium* Tausch

Allo scopo di valutare – in un caso esemplare – il fenomeno dell'erosione genica è stato preso in esame anche il fenomeno dell'ibridazione. *Rhododendron ferrugineum*, infatti, può ibridizzarsi con un'altra specie presente sull'arco alpino: *Rhododendron hirsutum*.

Queste due specie, nonostante le differenti esigenze ecologiche, riescono a coesistere in alcuni territori e dare origine ad un ibrido (*Rhododendron x intermedium*) in grado di incrociarsi sia con gli altri ibridi sia con i due parentali (fenomeno dell'introgresione) dando origine, nell'area stessa, ai cosiddetti sciami ibridi, ovvero l'insieme di individui di generazioni successive con caratteristiche sia morfologiche che genetiche più o meno simili a uno dei due parentali.

Le modificazioni ambientali stanno causando un progressivo rimpicciolimento delle aree occupate dalle due specie parentali ed un depauperamento delle loro popolazioni. Per questo motivo risulta di fondamentale importanza anche lo studio della specie ibrida, del suo valore adattativo all'ambiente modificato ed i flussi genici esistenti con le popolazioni parentali.

Obiettivo di questo lavoro era considerare le popolazioni delle tre specie di *Rhododendron*, campionate nei tre siti in cui è stata segnalata la loro co-presenza. Dopo una identificazione su base morfologica, osservandone le caratteristiche fogliari, si è programmata una identificazione utilizzando dei marcatori molecolari filogenetici. Sulla base dei risultati ottenuti, di ogni specie doveva essere valutata la diversità genetica e gli eventuali flussi genici, utilizzando marcatori molecolari microsatelliti.

Capitolo 2

Flora alpina: un deposito di specie rare

2.1 Tipi di rarità

Come Charles Darwin osservò nel 1859, nella sua *On the Origin of Species*, la rarità è un fenomeno che, nella storia naturale, è legato indissolubilmente con il processo dell'estinzione e con la liberazione di opportunità di vita per nuove specie. Dalla fine del Pleistocene, comunque, l'estinzione è stata favorita o direttamente provocata da interventi dell'uomo, sia diretti che indiretti. Ora, al fine di mantenere la diversità biologica, minacciata dall'espandersi degli impatti umani, le attività di conservazione biologica sono rivolte soprattutto alle specie rare.

Le piante vascolari possono essere rare per un'ampia varietà di ragioni. In linea generale, tuttavia, una specie è rara perché vive in un habitat molto limitato (rarità naturale) o perché il suo habitat è stato trasformato dall'uomo creando una sua elevata frammentazione e popolazioni poco numerose.

Il termine "raro" si riferisce principalmente alla distribuzione geografica e alle dimensioni delle popolazioni di una specie.

L'attento esame dei modelli di distribuzione e di abbondanza di una specie, unitamente ad altri inerenti le varie caratteristiche biologiche, permette di raggruppare le specie rare in classi distinte così da poter ottimizzare gli sforzi delle azioni di protezione.

Una classificazione particolarmente efficace delle rarità naturali è stata proposta da Rabinowitz (1981, 1986) che ha collegato la distribuzione geografica, con la specificità degli habitat e con l'abbondanza della popolazione. (Figura 2.1).

Distribuzione geografica	Ampia		Ristretta	
	Debole	Elevata	Debole	Elevata
Specificità dell' habitat				
Popolazioni locali grandi, talvolta dominanti	Specie abbondanti in una grande varietà di habitat (es.: <i>Chenopodium album</i>)	Specie abbondanti in un habitat specifico in un' ampia regione geografica (es. <i>Carex nigra</i> nelle torbiere basse)	Specie abbondanti in molti habitat in una regione geografica ristretta (sono noti pochissimi casi; es.: <i>Fuchsia procumbens</i> , endemica della Nuova Zelanda)	Specie abbondanti in un habitat specifico in una regione geografica ristretta (es.: <i>Sanguisorba dodecandra</i> , nelle Alpi valtellinesi)
Popolazioni locali piccole, non dominanti	Specie presenti con piccole popolazioni in un' ampia regione geografica e in molti habitat (es.: <i>Viola tricolor</i>)	Specie presenti con piccole popolazioni in un habitat specifico, in un' ampia regione geografica (es.: <i>Alisma plantago-aquatica</i> nei suoli palustri)	Specie presenti con piccole popolazioni in molti habitat, in una regione geografica ristretta. (Non sono noti casi di questo tipo).	Specie presenti con piccole popolazioni in un habitat specifico, in un' area geografica ristretta. (molte specie endemiche; es. endemiti del gen. <i>Primula</i>)

Figura 2.1 Le forme di rarità definite da Rabinowitz (da Ferrari, 2001).

Uno dei limiti di questa classificazione, tuttavia, è che le cause della rarità (ad esempio una limitata disponibilità di habitat idonei) non si distinguono dalle conseguenze della rarità (ad esempio la perdita di alleli rari).

2.2.1 La rarità periferica: sua importanza biologica

La pseudo-rarità o rarità periferica (Rabinowitz, 1981) è un fenomeno proprio di specie che sono rare in luoghi particolari ma comuni in altri. La relazione tra rarità e marginalità geografica risulta essere positiva (Hengeveld e Haeck, 1982; Brown, 1984; Nathal et al., 1996). La maggior parte delle specie rare in un territorio sono le specie che in questo territorio sono alla periferia della loro distribuzione geografica e le specie che si trovano in condizioni periferiche – sia geografiche che ecologiche - hanno maggiore probabilità di essere rare.

Le popolazioni geograficamente marginali hanno maggiori probabilità di essere in pericolo rispetto alle popolazioni centrali. Queste popolazioni tendono a trovarsi in ambienti meno adatti alla loro vita e sono spesso isolate dalle popolazioni più centrali e spazialmente continue. E' assai probabile che popolazioni marginali occupino nicchie ecologiche marginali rispetto alle condizioni centrali della variabilità adattativa della specie. Ne deriva la loro importanza sia ecologica che genetica (Conradt, 2001; Lesica e McCune, 2004; Case et al., 2005; Gapare et al., 2005; Holt e Keitt, 2005)

e, come suggerito dalle organizzazioni internazionali (IUCN, Consiglio Europeo), dovrebbero essere considerate una risorsa per la biodiversità e quindi essere incluse nelle azioni di conservazione. Nonostante la loro importanza però, solamente alcune popolazioni marginali di specie comuni sono oggetto di iniziative di conservazione (Fraser, 2000).

L'impatto umano è stato definito la principale minaccia per le popolazioni marginali:

- impatto diretto: pascolo e calpestamento
- impatto indiretto: diminuzione degli habitat adatti (in particolare nella Regione Mediterranea)

Inoltre il riscaldamento globale potrebbe essere visto come una minaccia, in particolare per le specie artico-alpine e orofite, anche se al momento non vi sono evidenze di un impatto attuale di questa minaccia sulle popolazioni studiate (Abeli et al., 2009).

Il livello di stress di una popolazione è inversamente legato al suo sforzo riproduttivo e di conseguenza, alla sua capacità di sopravvivenza (Parsons, 1990). Molti autori definiscono la capacità riproduttiva delle popolazioni marginali comparabile a quella delle popolazioni al centro dell'areale non evidenziando quindi alcun tipo di sofferenza dalla loro condizione marginale (Lammi et al., 1999; Channell, 2004; Kluth e Bruelheide, 2005; Yakimowsky e Eckert, 2007).

La rarità o un range ristretto non necessariamente implicano una minaccia di estinzione (Rabinowitz et al., 1986; Broennimann e al., 2005) ed è stata dimostrata la stabilità di numerose popolazioni marginali con un range ristretto (Gottlieb, 1973; Slagsvold, 1981; Henderson e Seaby, 1999; Channell, 2004).

La scala spaziale alla quale viene studiata una popolazione marginale è molto importante. Le popolazioni isolate si trovano in un ben definito range geografico. Un approccio biogeografico permette di enfatizzare l'importanza delle popolazioni marginali nell'ottica del l'areale totale, in prospettive conservazionistiche. Una specie può essere comune in una regione biogeografica (come *Rhododendron ferrugineum* nella regione Alpina) ma può presentarsi con singole popolazioni in un'altra regione biogeografica (come *Rhododendron ferrugineum* nell'Appennino tosco-emiliano) che diventa quindi d'importanza strategica per la conservazione della specie.

2.1.2 Principali caratteristiche delle popolazioni periferiche

Le popolazioni periferiche (o marginali) divergono dalle popolazioni al centro dell'areale per due processi: il flusso genico e la selezione naturale (Lesica e Allendorf, 1995).

Le popolazioni periferiche si trovano vicino al confine esterno dell'areale della specie e sono spesso relativamente piccole e isolate rispetto alle popolazioni centrali (Mayr, 1963; Lawton, 1993) e di conseguenza il flusso genico è ridotto. In condizioni naturali, le loro piccole dimensioni sono direttamente correlate alla rarità degli habitat adatti. Il numero ridotto di individui può dar luogo a una riduzione significativa dell'eterozigosità e della variabilità allelica (Nei et al., 1975; Allendorf, 1986; McCommass e Bryant, 1990). Le popolazioni periferiche con ridotti flussi di polline e semi, hanno maggiore probabilità di riprodursi per auto-impollinazione o per via vegetativa, con il conseguente incremento di individui di tipo clonale. Il ridotto flusso genico (isolamento), le piccole dimensioni delle popolazioni e l'effetto del fondatore, possono portare a una deriva genica con la conseguente riduzione della variabilità genetica e un incremento della differenziazione delle popolazioni marginali. Inoltre, le popolazioni si trovano in nicchie ecologiche marginali o in condizioni di stress. Per questo le popolazioni marginali sono spesso geneticamente differenti in seguito alla divergente selezione naturale.

Può accadere che l'elevata diversità delle condizioni ambientali marginali influisca sull'eterozigosità delle popolazioni periferiche mantenendola elevata e agendo contro la scarsa variabilità genetica tipica delle popolazioni di ridotte dimensioni. La variabilità genetica delle popolazioni marginali è comunque da attendersi inferiore rispetto alle popolazioni di grandi dimensioni collocate nell'ambiente ottimale, al centro dell'areale (Lesica e Allendorf, 1995).

Valore per la conservazione

E' ampiamente noto che la conservazione della specie punta, innanzitutto, alla protezione della variabilità genetica presente in tutto il suo range di distribuzione (Ehrlich, 1988). Infatti gli ambienti cambiano continuamente e per sopravvivere gli organismi devono avere una variabilità genetica tale da permettergli di evolvere (Gilpin e Soule, 1986).

La variabilità genetica è suddivisa sia all'interno delle popolazioni che tra una popolazione e l'altra. Salvaguardare le caratteristiche interne delle popolazioni implica la protezione di grandi popolazioni vitali (popolazioni centrali) che non perderanno variabilità in seguito a deriva genica. Importante è conservare anche le popolazioni marginali che sono spesso sia geneticamente che

morfologicamente diverse dalle popolazioni centrali; salvaguardare questa diversità implica la conservazione di quegli adattamenti che permettono alle popolazioni marginali di sopravvivere in condizioni ambientali critiche. Le popolazioni marginali, quindi, potrebbero essere importanti per la sopravvivenza e l'evoluzione delle specie e spesso hanno un alto valore per la conservazione.

Il flusso genico delle popolazioni periferiche è ridotto a causa del loro isolamento. Il basso flusso genico di queste popolazioni ridurrà l'alto flusso genico delle popolazioni centrali promuovendo cambiamenti nella frequenza degli alleli comuni in quanto avranno il sopravvento i nuovi alleli selezionati dalle condizioni ambientali periferiche. Per tale motivo le azioni di conservazione delle popolazioni periferiche si rendono necessarie soprattutto nell'ottica di eventi di speciazione futuri a partire da queste popolazioni marginali.

2.2 Le orofite alpine nelle catene montuose sud europee

Le orofite sono specie vegetali che si sono adattate alle condizioni montane, nel senso più ampio, cioè inclusi tutti i livelli biologici e non solo quello di alta montagna, oltre il limite degli alberi. La determinazione del limite altitudinale inferiore per il bioma orofitico è stato fissato a 500 metri per l'Europa centrale (Ozenda, 2002).

Il termine alpino ha due differenti significati:

- ciò che caratterizza le alte montagne, relativo a range diversi; si parla quindi di fascia alpina e flora alpina.
- ciò che si riferisce all'arco alpino stesso, a volte sostituito con il termine alpico.

Sulla base degli studi fatti sulla storia della vegetazione dell'arco alpino si pensa che la maggior parte delle specie orofite siano nate nell'epoca del Pliocene, in particolare per quanti riguarda le specie dei Pirenei, dei Carpazi e dei Balcani.

Tenendo conto dell'altitudine media delle montagne d'Europa (dai Pirenei, ai Carpazi fino ai Balcani del nord) potrebbe sembrare che l'arco alpino sia al centro di un sistema montuoso complesso. (Figura 2.2).

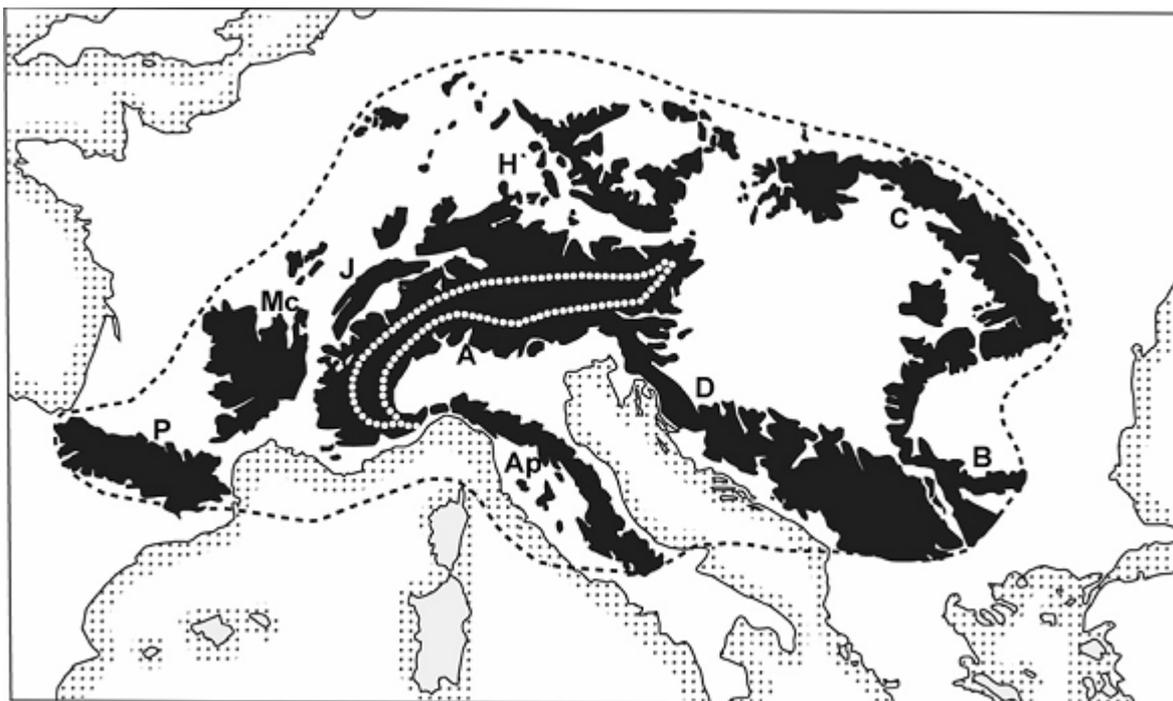


Figura 2.2 Il sistema alpino (Ozenda, 2009). In nero i territori situati oltre i 500 m slm. A: Alpi (l'asse intra-alpino è delimitato dalla linea tratteggiata bianca), Mc: massiccio centrale francese; J: Giura, Ap: Appennino settentrionali, D: Alpi Dinariche, C: Carpazi, B: Balcani, H: monti medi germanici.

L'unità e l'originalità di questo sistema è evidente nella sua flora (la sua area coincide chiaramente con l'areale di distribuzione di *Abies alba*, *Quercus pubescens* e *Rhododendron ferrugineum*) o nei suoi significativi endemismi (Ozenda, 1990; Aeschimann et al., 2004).

C'è ancora molto lavoro da fare per definire la storia delle piante con i recenti sviluppi nella geologia delle Alpi e più in generale, del sud Europa.

In particolare l'impatto delle glaciazioni sulle piante è molto più complesso di quello che possa sembrare, in quanto occorre tener conto anche delle fasi interglaciali che sono periodi di attiva formazione della copertura vegetale. Lo studio dell'epoca tardo-glaciale e dell'Olocene è sicuramente uno strumento importante per valutare l'attuale flora alpina. Le popolazioni delle montagne sono il risultato di: specie autoctone, formate sul posto durante lo sviluppo della catena montuosa, e di specie migrate da altre catene montuose.

La prima flora orofita delle Alpi si è formata da una flora di pianura che includeva un mix di specie tropicali e subtropicali insieme a specie più temperate (Scharfetter, 1938). Molti generi sono sopravvissuti a questa flora iniziale, specie endemiche del sistema alpino ma chiaramente legate a

gruppi tropicali: *Borderea* e *Ramonda* (Pirenei), *Berardia* (Alpi occidentali). Questi relitti sono principalmente presenti nella parte meridionale del sistema alpino: Pirenei (soprattutto nella parte spagnola) e Balcani, dove si sono rifugiati durante le fasi di maggiore espansione glaciale.

La maggior parte delle orofite alpine risalgono probabilmente al Pliocene e derivano da una flora simile e temperata che attualmente si trova in Europa Centrale e Meridionale. Il Pleistocene, con le sue fasi glaciali-interglaciali ha agito soprattutto sulla distribuzione di specie già originatesi nel Pliocene (Comes e Kadereit, 1998; Kadereit et al., 2004). e, in alcuni casi, ha favorito la speciazione simpatica da specie preesistenti (come nei generi *Primula* e *Saxifraga*).

Questi processi hanno favorito, tra l'altro, due tipi generali di endemismi:

- specie che sono endemiche di una sola catena montuosa ad esempio solo delle Alpi, solo dei Pirenei, solo degli Appennini settentrionali
- specie che esistono in più zone ma che sono assenti fuori dal sistema alpino (ad esempio *Rhododendron ferrugineum*).

Da quanto detto si deduce come abbiano avuto un ruolo molto importante nella formazione della flora alpina gli scambi tra aree diverse del sistema alpino. Una gran parte di questi scambi può certamente essere attribuita ai meccanismi di ampia dispersione (semi, parti di infiorescenze), ma le migrazioni all'interno del sistema sono state certamente facilitate dalla presenza di rilievi intermedi tra le catene di grandi dimensioni. Ad esempio i legami tra l'arco alpino e i Pirenei possono essere stati svolti grazie alla presenza di rilievi che attualmente sono molto rimpiccioliti o addirittura spariti (Massiccio centrale e monti della Provenza) (Ozenda, 2009).

Nell'Appennino settentrionale, le glaciazioni quaternarie hanno lasciato segni evidenti specialmente nei versanti settentrionali dell'Appennino (Losacco, 1982): rocce levigate, valli glaciali sbarrate da ammassi morenici, circhi glaciali ora colmi d'acqua ora di torba con polline fossile lo studio del quale ha consentito di ricostruire le vegetazioni passate di questo tratto dell'Appennino (Ferrarini, 1977). La maggior parte delle entità che oggi popolano l'Appennino settentrionale proviene dall'arco alpino; molte vi sono pervenute quando il clima era più freddo dell'attuale e vi sono rimaste, accantonate non differenziate, in poche stazioni (Ferrarini, 1977), mentre altre si sono differenziate in nuove entità endemiche, come *Primula appennina* o come *Murbeckiella zanonii* (Ferrarini, 1979). Se percorriamo da nord a sud la catena appenninica troviamo via via il limite meridionale dell'areale di numerose entità, fenomeno noto come "caduta floristica"; questo è

particolarmente evidente in alcune porzioni della catena, tra le quali l'Appennino Tosco-Emiliano ed in particolare nella zona del Passo dell'Abetone, forse per le particolari condizioni delle cime, superiori ai 1900 m, con basse temperature medie annue e con alti innevamenti. Tali condizioni hanno consentito la persistenza anche di un'importante cenosi relitta d'abete rosso (Chiarugi, 1936; Ferrarini, 1977) oltre a quella del rododendro stesso.

Da questa rapida sintesi emerge una delle ragioni che rende importante la protezione degli ambienti naturali che ospitano le piante più rare: esse rappresentano specie a ridotta adattabilità dal punto di vista delle condizioni ambientali e sono quindi dei buoni indicatori dello stato di salute degli ambienti anch'essi rari, o addirittura esclusivi, e - come tali - devono essere oggetto di attività di conservazione e tutela.

2.3 Il problema dei cambiamenti climatici

Le minacce che agiscono sulla flora di montagna sono quelle che fondamentalmente agiscono sull'intera biodiversità ed anche sull'uomo e la sua salute.

Thuiller (2007) mette in evidenza le minacce alla biodiversità mentre la IUNC (Union for Conservation of Nature) (www.iuncredlist.org) le raggruppa in 11 categorie.

Le minacce che attualmente agiscono sulla flora di montagna in Europa sono per lo più di natura antropica, sia dirette (distruzione di habitat, infrastrutture turistiche e viarie) che indirette (cambiamento dell'uso del suolo come abbandono del pascolo o dell'agricoltura tradizionale e conseguente eccessivo imboschimento che causa uniformità ambientale).

A volte intervengono anche fattori interni alla pianta come ad esempio l'isolamento genetico dovuto all'isolamento geografico delle popolazioni che spesso sono frammentate.

Un'altra minaccia è il “*Global Change*” ovvero l'aumento delle temperature, la diminuzione e l'irregolarità delle precipitazioni (*climate change*), lo scioglimento dei ghiacciai, l'effetto serra. Queste minacce sono principalmente dovute al riscaldamento dell'atmosfera terrestre a causa dell'arricchimento dei gas atmosferici con CO₂ e la diminuzione dello strato di ozono.

Il principale effetto del *climate change* sulla flora alpina è la risalita in quota delle specie alpine e nivali. Parolo e Rossi (2008) evidenziano due tipi di specie: uno che è in grado di muoversi velocemente (*fast migrant*) che ha un tasso di risalita di 58,7 m/decade, e uno che si muove lentamente (*slow migrant*) che ha un tasso di risalita di 13 m/decade.

Le specie *fast migrant* riescono a risalire in modo così efficace grazie alla presenza di diaspore (semi e spore) molto leggere o dotate di appendici che favoriscono comunque il trasporto da parte del vento. Le specie *slow migrant*, al contrario, hanno semi a lenta risalita e sono quindi più soggette all'estinzione locale o comunque sono sfavorite rispetto alle altre specie che sono in grado di adattarsi più velocemente alle nuove condizioni spingendosi in breve tempo più a monte, dove sussistono le condizioni ambientali adatte alla loro crescita. Queste ultime specie molto veloci hanno però due problemi: la quota di montagna, avendo ormai raggiunto la vetta, e la risalita di piante competitive e il conseguente rischio di estinzione. Inoltre questi movimenti della flora verso l'alto portano a una conseguente banalizzazione della flora alpina europea con la perdita entro il 2080 del 60% delle specie presenti e la loro sostituzione con altre specie per il 70% (Thuiller et al., 2005) abbattendo quindi il livello di biodiversità presente in queste zone.

Le alte montagne, al pari delle zone artiche, sono aree fredde, dove la flora è adattata a vivere in condizioni estreme e quindi probabilmente, incapace di adattarsi a cambiamenti sostanziali. Essere specializzati, come *Rhododendron ferrugineum*, che è una specie chionofila (cioè adattata a crescere in siti dove permane per molto tempo la neve al suolo), può portare al pericolo di estinzione, in caso di modificazioni profonde delle condizioni di vita.

Ci sono tre modi con cui le piante di montagna possono rispondere ai cambiamenti climatici:

- adattarsi al clima modificato,
- spostarsi in una zona con un clima più adatto,
- estinguersi.

Una pianta può adattarsi ai cambiamenti climatici in diversi modi come: graduale adattamento genetico delle popolazioni, plasticità fenotipica (ovvero adattare il proprio fenotipo al nuovo ambiente) oppure preferendo un climax edafico rispetto a un climax climatico.

Prove raccolte dai cambiamenti climatici passati tendono ad indicare che le specie sono più propense a spostarsi verso posti più adatti che non adattarsi geneticamente (Huntley, 1991). Tuttavia vi sono anche evidenze che in particolari siti (lunata, cioè zone di alta quota non coperte da neve o ghiaccio) molte specie di origine terziaria, resistenti al freddo, sono sopravvissute alle crisi glaciali. In accordo con Scharfetter (1938), nel corso dei periodi interglaciali più caldi, le foreste delle basse montagne (1800-2300 m) sono salite più in alto verso le vette, causando la riduzione di numerose popolazioni di orofite. Molte orofite isolate, che ora vivono nei rifugi glaciali, come i

picchi delle basse montagne delle Alpi, sono minacciate in quanto è impossibile per loro migrare più in alto sia perché non sono in grado di muoversi così rapidamente sia perché la zona nivale non è presente.

La presenza di specie relitte del Terziario su scogliere montane e subalpine nelle regioni meridionali e sud-orientali delle Alpi, soprattutto su suoli calcarei, è un esempio di persistenza ed adattamento alle condizioni climatiche. Inoltre la persistenza può essere supportata dalla grande longevità (centinaia di anni) di molte piante alpine (in particolare le piante clonali che, attraverso la crescita vegetativa, formano strati più o meno estesi) come ad esempio *Rhododendron ferrugineum* (Pornon ed Escaravage, 1999). Le piante clonali, in particolare quelle con un tipo di crescita “a falange”, possono resistere e competere con le specie invasive (Pornon e Doche, 1994; Escaravage, 1997).

In passato le glaciazioni hanno portato alla frammentazione e a volte alla scomparsa delle popolazioni di alcune specie in tutto l'arco alpino, tuttavia le glaciazioni hanno generato rinvigorismento ed evoluzione della flora alpina stessa. Infatti ai margini delle Alpi, in particolare nelle Alpi orientali, le popolazioni locali sono entrate in contatto con popolazioni provenienti da altre regioni, come ad esempio i Balcani, a causa delle nuove condizioni ecologiche e si sono speso ibridizzate con queste o più raramente, tra di loro. Questo ha portato alla poliploidia che è considerato un meccanismo rapido di adeguamento alle nuove condizioni ecologiche. Alla fine delle glaciazioni le nuove specie poliploidi meglio adattate all'ambiente hanno potuto espandere il loro areale e colonizzare nuovi territori (Favarger e Galland, 1996). Allo stato attuale, il riscaldamento agisce in modo opposto; infatti, sebbene i cambiamenti climatici possano rapidamente fornire nuove condizioni ecologiche, è molto improbabile, a causa delle barriere di dispersione, che le diverse popolazioni a basse quote occupino rapidamente i nuovi territori a quote più elevate, né creino fenomeni di ibridazione o poliploidia con le specie già presenti. In ogni caso, per le specie relativamente legate da poter effettuare con successo un'ibridazione, il cambiamento climatico può provocare un isolamento dell'habitat degli ibridi dagli habitat parentali, permettendo così l'evoluzione di specie distinte, cioè lontane dai parentali (isolamento genetico) e dalle specie concorrenti (isolamento ecologico) (Gugerli, 1997).

Molti casi dimostrano che la forte selezione indotta da un cambiamento climatico può rapidamente creare differenziazione genetica tra le popolazioni (Theurillat et al., 1998). La diversità genetica è un importante requisito per l'adattamento alle nuove condizioni ambientali che si vengono a creare.

La distribuzione attuale di molte specie endemiche regionali è conseguenza di un impoverimento genetico che ha impedito una maggiore espansione.

La frammentazione delle popolazioni è di particolare importanza per le specie endemiche e per le orofite. Se queste specie non possono persistere in una determinata area, mostrano una distribuzione frammentata o disgiunta (nord-sud, est-ovest) o addirittura possono estinguersi localmente.

2.4 L'importanza della copertura nevosa

La copertura nevosa ha un'influenza rilevante sulla vegetazione oltre il limite altitudinale degli alberi.

Il manto nevoso ha un importante ruolo di protezione contro l'inaridimento e l'eccessivo raffreddamento del terreno; sotto la neve il terreno viene mantenuto costantemente umido, sia in rapporto al lento stillicidio della neve stessa, sia per la difesa che questa esplica nei confronti dei venti che in montagna hanno un elevatissimo potere di evaporazione, in rapporto al deficit di saturazione dell'atmosfera; inoltre sotto la protezione termica della neve il terreno non gela o gela per brevi momenti; da qui la perenne attività delle piante alpine, moltissime delle quali sono sempre verdi come le Ericacee, e il loro immediato rigoglio vegetativo appena la neve scompare in primavera; la loro attività non subisce sosta invernale ma solo un rallentamento di intensità.

Concorre a questo fenomeno dell'attività vegetativa perdurante sotto la neve il fatto importante che la coltre nevosa a meno che non sia eccezionalmente potente, permette il filtrare della luce sino al terreno, di una luce diffusa, sia pur tenue, che permette il continuarsi dell'attività fotosintetica.

In linea meno saliente, ma non per questo trascurabile, la neve esplica azioni favorevoli sulla vegetazione riflettendo le dirette irradiazioni solari e innalzando così la temperatura dell'ambiente, captando il pulviscolo e i detriti tra i quali quelli organici che abbandonati sul terreno, quando si sciolgono le nevi, creano o migliorano la coltre terrosa, costituendo riserve d'acqua per la stagione estiva e favorendo la diffusione delle specie alpine e dei loro disseminuli (spore, conidi, semi, frutti).

Ma la copertura nevosa ha anche effetti negativi sulla vegetazione. La neve gelata e pulverulenta, turbinata dal vento, agisce come polvere di smeriglio e corrode le piante legnose portandole talora alla morte; riflettendo fortemente i raggi solari, determina un forte abbassamento di temperature alla sua superficie superiore, una zona di gelo che è nociva per quelle porzioni di piante che emergono dallo strato di neve; l'innnevamento troppo prolungato abbrevia il periodo vegetativo e talora lo

annulla completamente. Infine con il suo peso la neve determina facilmente danni e schianti alle piante innevate, da qui l'affermarsi degli arbusti nani alle maggiori altitudini.

2.5 Strategie di conservazione e progetti correlati

La conservazione riguarda sempre – in ultima analisi - le risorse genetiche, se non altro come salvaguardia del risultato del processo di evoluzione che ha avuto inizio 4,5 milioni di anni fa (Eisner et al., 1995).

I dati concernenti il livello e la distribuzione della variabilità genetica, le caratteristiche biologiche e riproduttive, nonché un'attenta analisi delle minacce alle quali le varie specie sono soggette, permettono di scegliere la strategia di conservazione più adatta.

Il processo di conservazione deve essere indirizzato a tutti i livelli di organizzazione biologica (Rajora et al., 2000):

- conservazione a livello di gene: si preferisce conservare tutto il pool genico di una popolazione invece che i singoli alleli; la conservazione di un particolare carattere, dovuto all'effetto di uno o più alleli, avviene tramite la conservazione dei genotipi portatori del carattere stesso (ad esempio quello che si fa con il genere *Prunus* L. in cui vengono selezionate alcune caratteristiche particolari e conservate attraverso la propagazione vegetativa),
- conservazione a livello di specie: essendo le risorse disponibili per questo tipo di conservazione molto limitate rispetto al numero di specie che necessitano di tutela, è stata definita una scala di priorità di conservazione che si basa sui seguenti caratteri delle specie:
 - o livello di rarità e di pericolo di estinzione in cui si trovano le specie, cercando di estendere la tutela al più alto numero di pool genici possibile (Millar e Libby, 1991). I taxa monofiletici rappresentano comunque il primo step di conservazione in particolare per il loro elevato valore evolutivo.
 - o Utilità delle specie per l'uomo.
 - o Valenza ecologica (Falk, 1991).

La tendenza generale è quella di conservare le popolazioni con adattamento locale, anche se non rappresentano l'intera variabilità genetica della specie.

- conservazione a livello di popolazione, comunità, ecosistema: il pool genico di una popolazione naturale si trova in armonia con l'ambiente in cui la popolazione si è adattata a vivere e può essere mantenuto nelle generazioni successive solo nello stesso contesto ambientale. Quando una popolazione viene ad essere eliminata, ridotta o incrociata con un'altra, il pool genico originario non può essere ricostruito. Per questi motivi la conservazione dovrà riguardare tutte le componenti che interagiscono con la popolazione ovvero si deve realizzare una conservazione anche degli habitat.

Le strategie di conservazione dipendono:

- dalla natura degli organismi: la lunghezza dei cicli vitali, i sistemi di accoppiamento, la dimensione degli individui.
- Dalla scala temporale: si dovranno prevedere i pericoli, i livelli di minaccia e lo stato di salute delle generazioni successive della specie oggetto di tutela,
- Dalla realtà socio-economica nella quale si trova la specie da conservare,
- Dall'obiettivo della conservazione: ovvero dal grado di tutela necessario, Si può distinguere:
 - o Conservazione dell'adattabilità genetica: è l'obiettivo più importante da conseguire ed ha valenza massima per tutte le specie. Nel caso in cui l'interesse non sia solo la conservazione delle frequenze alleliche ma anche i processi di adattamento senza perdita della fitness delle popolazioni, si possono effettuare strategie di conservazione dette evolutionary conservation strategies.
 - o Conservazione della potenzialità genetica necessaria all'espressione di particolari caratteri fenotipici,
 - o Conservazione della massima variabilità: mira alla conservazione di tutte le caratteristiche (sia attuali sia future) di una specie.

Da un punto di vista generale gli interventi di conservazione delle risorse genetiche vegetali possono essere:

- Conservazione *in situ*: ha come oggetto soprattutto la popolazione e l'ecosistema, ma può essere una strategia mirata anche ad una singola specie. In questo caso la conservazione comporta il mantenimento della specie, delle comunità di cui fa parte e degli ambienti nei quali si è adattata (Frankel, 1976). La conservazione *in situ* rappresenta l'approccio

maggiormente attento alla componente evolutiva delle specie (Finkeldey e Gregorius, 1994) perché all'interno dell'habitat naturale può essere mantenuto l'intero range dei processi evolutivi, degli adattamenti ai cambiamenti climatico-ambientali e delle relazioni con gli organismi simbiotici o patogeni.

- Conservazione *ex situ*: il protocollo *ex situ* è finalizzato alla conservazione del germoplasma in ambienti artificiali (Wang et al., 1993). Questa strategia viene applicata qualora non fosse possibile applicare la conservazione *in situ*, nel caso di specie rare, di popolazioni in declino, di popolazioni attaccate da nuovi patogeni o di pool genici primari a rischio di inquinamento.

Seguendo un criterio di distinzione di tipo evolutivo, le strategie possono essere classificate anche come:

- conservazione statica: tende a mantenere invariata l'informazione genetica del materiale da conservare, sottraendolo ai processi evolutivi che avvengono negli ambienti naturali. Può essere effettuata solo *ex situ*.
- Conservazione dinamica: rende possibile l'azione dei processi evolutivi ed il progressivo adattamento del materiale biologico alle condizioni ecologiche degli ambienti naturali. Si può effettuare sia *in situ* che *ex situ*.

Nonostante le varie tecniche di conservazione, non è possibile conservare il materiale vegetale garantendone una completa integrità genetica per sempre. Bisogna, infatti, tener conto che esistono processi che portano a un'inevitabile perdita di informazione genetica (erosione genetica) che possono agire sia durante la conservazione *in situ* (ibridazione, mutazione, selezione, cambiamenti nell'ambiente) che *ex situ* (cambiamenti biologici del materiale conservato durante lo stoccaggio).

L'analisi della variabilità genetica di una popolazione ai fini di impostare opportune strategie di conservazione può essere effettuata mediante l'uso di tecniche biomolecolari, capaci di rilevare la diversità (mutazioni) di regioni di DNA omologhe in individui appartenenti alla stessa specie. Queste tecniche si basano sull'identificazione di specifiche regioni di DNA (loci genomici) che in virtù della loro presenza caratterizzano in modo univoco una determinata regione del DNA e quindi l'individuo a cui appartiene. Tra i marcatori più utilizzati a scopo conservazionistico vi sono gli AFLP e i marcatori microsatelliti (SSR).

La conservazione ex situ

Un'attenzione crescente viene rivolta alla conservazione della biodiversità vegetale al di fuori degli ambienti naturali, sia per le specie di interesse agronomico, sia per la flora spontanea, anche in attuazione agli obblighi previsti dalla Convenzione sulla Diversità Biologica (Rio de Janeiro, 1992). Quest'ultima, infatti, all'articolo 9 "Conservazione ex situ" indica una serie di misure da adottare per il recupero, la ricostituzione e la reintroduzione di specie minacciate a completamento delle strategie di conservazione *in situ*. Inoltre, il quarto report dell'Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) indica la conservazione *ex situ* tra le principali azioni di adattamento degli ecosistemi ai cambiamenti climatici in corso. La conservazione *in situ* (aree di origine) e quella *on farm* (nelle aree di coltivazione) sono prioritarie, ma quella *ex situ* (banche genetiche, collezioni, orti botanici, ecc.) si rende indispensabile in quei casi, e sono tanti, in cui le prime due, per motivi diversi, sono difficili da realizzare. Attualmente, infatti, le molteplici pressioni che agiscono sugli habitat possono in alcuni casi minacciare la sopravvivenza di una o più specie o l'integrità e la funzionalità di interi ecosistemi, tanto da rendere difficile attuare strategie di conservazione *in situ*. In questi casi, solo le tecniche *ex situ* possono garantire la conservazione della variabilità genetica del germoplasma (semi, polline, parti di pianta, spore, ecc.) e quindi la rigenerazione, riproduzione e/o moltiplicazione delle specie da conservare.

I due tipi di conservazione, *in situ* ed *ex situ*, presentano caratteristiche diverse e sono fra loro complementari. Nella prima il germoplasma risulta esposto alle interazioni dirette con l'ambiente ed è quindi soggetto ai processi evolutivi e co-evolutivi, mentre nella seconda il germoplasma tende a mantenere l'integrità genetica di partenza (la conservazione *ex situ* viene infatti talvolta indicata con il termine di "preservazione"), nonostante anche in questo caso possano avvenire variazioni genetiche dovute ad esempio al diverso potenziale di conservazione del materiale e alla diversa pressione selettiva che subentra durante le attività di rigenerazione e/o moltiplicazione. La conservazione *ex situ* viene attuata principalmente attraverso banche del germoplasma che, sorte inizialmente in ambito agricolo, per il 90% conservano attualmente specie di interesse alimentare e piante comuni che rivestono un'importanza economica su scala mondiale. Recentemente, tuttavia, si sta assistendo alla diffusione di banche del germoplasma dedicate alla conservazione della flora rara, minacciata, endemica e protetta, e di tutte quelle entità considerate importanti per il mantenimento della biodiversità. Ciò allo scopo non solo di preservare la diversità genetica in sé,

ma anche di rendere disponibili materiali vegetali di provenienza certificata per interventi di riqualificazione, recupero e gestione del territorio.

Di tutte le forme di conservazione *ex situ*, le più diffuse sono le collezioni di semi e le collezioni di piante in campo, mentre piuttosto rare sono le collezioni in vitro e ancor più rare quelle a bassissime temperature (- 196°C), incluse le banche di DNA. Esistono tuttavia anche sistemi di conservazione di polline e spore. Altre tecnologie come il DNA banking possono trovare interessanti applicazioni anche se in ambiti più legati alla ricerca piuttosto che alla conservazione volta alla rigenerazione e alla propagazione a partire dal germoplasma conservato.

Progetti per la conservazione

Per ciò che riguarda in particolare la conservazione *ex situ* della flora spontanea italiana, minacciata e non, l'attenzione va posta preliminarmente sulla tematica relativa alle liste rosse, quale strumento tecnico-pratico, propedeutico alla definizione delle specie spontanee prioritarie da raccogliere e conservare, anche ai fini di eventuali azioni di reintroduzione.

Nel 1992 fu sottoscritta la CBD, convenzione internazionale per la conservazione della diversità biologica (Earth Summit di Rio de Janeiro), poi ufficialmente adottata da molti paesi, tra cui l'Italia, che la ratificò nel 1994 con la Legge n. 124 del 14-2-1994. Per l'attuazione delle tematiche legate alla conservazione del mondo vegetale seguirono nel 2002 due importanti piani strategici: a livello globale la GSPC, Global Strategy for Plant Conservation (Decisione VI/9); a livello continentale la EPCS, European Plant Conservation Strategy, che fu adottata dal Consiglio d'Europa, congiuntamente a *Planta Europa* (2008). Gli obiettivi riguardano la conoscenza e la documentazione della biodiversità vegetale, la sua conservazione e uso sostenibile, così come la promozione dell'educazione, della consapevolezza e della capacità di conservazione, nonché della condivisione e scambio delle conoscenze, anche mediante la creazione di reti internazionali.

Il progetto internazionale per la conservazione dei semi è il Millenium Seed Bank Project avviato nel 2000 presso i Kew Gardens di Londra. I principali obiettivi del progetto sono:

- raccogliere 24.000 specie di piante entro il 2010, che rappresentano il 10% della flora della terraferma
- raccogliere tutti i semi della flora autoctona della Gran Bretagna
- svolgere ricerche sulla conservazione e sulla salvaguardia dei semi e delle piante

- diventare un importante punto di riferimento per la ricerca e incoraggiare l'interesse pubblico.

Nel 2004 è stato approvato il testo di un protocollo d'intesa per dar vita ad una rete italiana di banche del germoplasma, denominata RIBES, Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea; essa si occuperà di progetti a livello nazionale, riguardanti specie a rischio di estinzione e quelle utili per interventi di rinaturalizzazione.

Il genere *Rhododendron* L. nella Flora Europea

Capitolo 3

Il genere *Rhododendron* L.

Il genere *Rhododendron* è particolarmente ricco di specie e varietà, tanto che la tassonomia risulta notevolmente complessa; a questo genere sono stati assegnati attualmente circa 2000 taxa di piante arbustive sempreverdi. Geograficamente, il genere è originario di America ed Eurasia, mentre, etimologicamente, il suo nome deriva dal greco “rhodon”, cioè “rosa” e “dendron”, che significa “albero”. Tale nome si deve alle vistose infiorescenze che caratterizzano le specie del genere *Rhododendron* e che le rendono apprezzate piante ornamentali.

Linneo fu il primo studioso a tentare una tassonomia per il genere *Rhododendron* e, sin dall’inizio, riscontrò delle difficoltà a causa del gran numero di varietà. Linneo nel 1753 creò il gruppo botanico *Rhododendron* separandolo dal genere “Azaleas”, che comprendeva solamente 6 specie. Nel 1796 Salisbury sottolineò come non fosse possibile tenere azalee e rododendri in due generi distinti. Nel 1834 fu George Don a suddividere il genere *Rhododendron* in 8 sottogeneri che, con più o meno modifiche, sono stati mantenuti fino al 2004.

Gli studi sistematici che hanno riguardato tutti i sottogeneri e le sezioni di *Rhododendron* sono stati iniziati da Sleumer (1949) che ha proposto un vasto sistema di classificazione di questo Genere sottoforma di scala con sottogeneri, sezioni e sottosezioni. Successivamente le conclusioni di altri studi tassonomici incentrati principalmente sulla morfologia (Sleumer, 1980; Cullen, 1980; Chamberlain, 1982; Philipson e Philipson, 1986; Judd e Kron, 1995) hanno prodotto una classificazione di *Rhododendron* alternativa. Questo sistema tassonomico era ormai generalmente accettato dagli studiosi di *Rhododendron* (Cox e Cox, 1997) perché raggruppante i risultati di quasi tutti gli studi morfologici a partire dal 1950.

Vari studi sono stati condotti fino al 1996 quando Chamberlain e i suoi collaboratori pubblicarono una nuova scala tassonomica del genere *Rhododendron*. Differenze significative tra il sistema tassonomico di Sleumer (1949, 1980) e di Chamberlain (1996) riguardano il sottogenere *Therorhodion*, che Sleumer colloca fuori dal genere *Rhododendron*, e la collocazione delle quattro specie della sezione *Sciadorhodian*. Basandosi sugli studi di Judd e Kron (1995), Chamberlain assegna queste specie al sottogenere *Pentanthera* mentre Sleumer li fonde con la sezione *Brachycolix* nel sottogenere *Anthodendron*, equivalente al sottogenere *Tsutsusi* (Chamberlain e Rae, 1990).

Esistono tre lavori basati su analisi di tipo molecolare per lo studio della tassonomia di *Rhododendron*:

- il primo utilizza i geni plastidiali matK e trnK (Kurashige et al., 2001)
- il secondo utilizza lo spaziatore nucleare ITS (Gao et al, 2002)
- il terzo effettua un'analisi cladistica basata sul gene RPB2-I che codifica per la subunità maggiore dell'RNA polimerasi II (Goetsch et al., 2005).

In tutti e tre i lavori si riscontrano gli stessi problemi di classificazione ma vi sono alcune novità nel sistema di classificazione di Goetsch.

In primo luogo Goetsch e i suoi collaboratori hanno verificato che i sottogeneri e le sezioni, basate sulla morfologia delle varie specie, proposti da Sleumer (1949, 1980) e Chamberlain e al. (1996) sono monofiletici.

Un secondo obiettivo del lavoro di questi studiosi era quello di risolvere, a prescindere da questa o altre proposte tassonomiche, i rapporti tra tutte le sezioni di *Rhododendron*, comprese le sottosezioni *Ledum* e *Menziesia* (Kron e Judd, 1990).

I gruppi monofiletici così individuati, unitamente alle informazioni morfologiche, hanno costituito la base per un nuovo sistema di classificazione del genere *Rhododendron* (Figura 3.1).

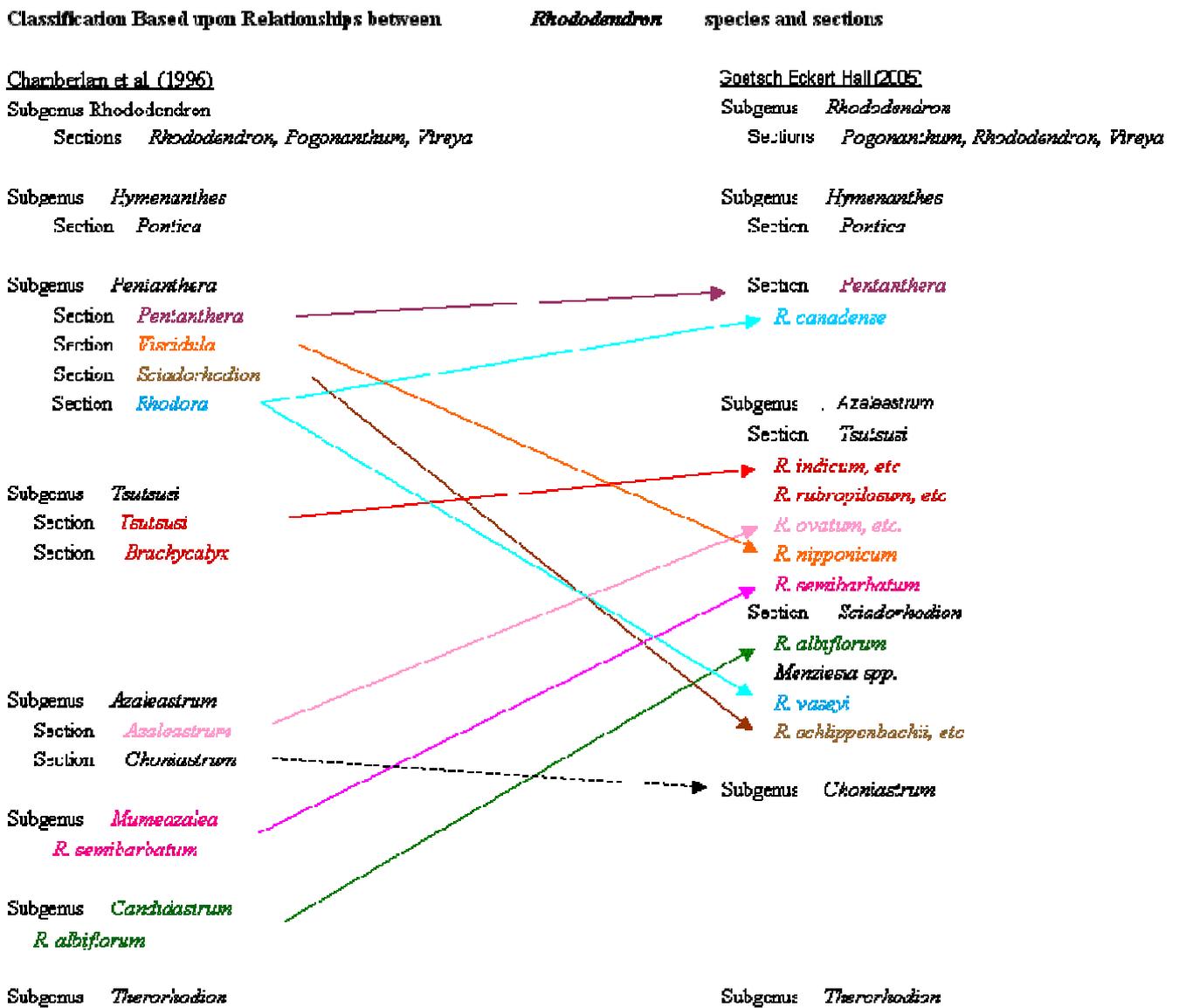


Figura 3.1 Sistema di classificazione del genere *Rhododendron* proposto da Chamberlain (1996) in cui si evidenziano la suddivisione in 8 sottogeneri, confrontato con il sistema tassonomico proposto da Goetsch (2004) che prevedeva solo 5 sottogeneri.

In questo lavoro sono state prese in considerazione le specie *Rhododendron ferrugineum* L. e *Rhododendron hirsutum* L. ed il putativo ibrido *Rhododendron x intermedium* Tausch., nato dall'incrocio delle due specie precedenti.

3.1 *Rhododendron ferrugineum* L.

Rhododendron ferrugineum L. è un arbusto cespuglioso sempreverde comunemente noto come Rosa delle Alpi. Il nome prende spunto dagli appariscenti fiori color rosso-porpora; infatti il termine *Rhododendron* deriva dalle parole greche “rhodon” che significa rosa, “dendron” che significa albero e “ferrugineum” che significa color ruggine.

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Ericales

Famiglia: Ericaceae

Genere: *Rhododendron*

Sottogenere: *Rhododendron*

Sezione: *Rhododendron*

Sottosezione: *Rhododendron*

Specie: *ferrugineum*.



Figura 3.2: Infiorescenza di *Rhododendron ferrugineum* L.

Il fusto è legnoso, ascendente e molto ramificato. Le foglie, coriacee, brevemente picciolate, lunghe da 2 a 3,5 cm, sono addensate all’apice dei rami; sono ovoidali con margine intero. Caratteristica di queste foglie è la presenza sulla pagina superiore di una lamina coriacea che limita la traspirazione e quindi la perdita d’acqua; sulla pagina inferiore sono invece presenti delle ghiandole ferruginee che rappresentano dei “tricomi” cioè peli ghiandolari vegetali pluricellulari, con l’aspetto di scaglie, che producono composti chimici, tossici o comunque non graditi agli erbivori. Inoltre il rododendro cresce su terreni dove vi è una grande quantità di ferro libero il cui eccesso è tossico, quindi è costretto a sequestrarlo nelle ghiandole ferruginee (Figura 3.3).



Figura 3.3 Pagina superiore ed inferiore di foglia di *Rhododendron ferrugineum* L.

I fiori rosso purpurei, portati da un peduncolo lungo 1-2 cm; hanno un caratteristico odore resinoso e formano un'infiorescenza costituita da 5 a 22 fiori nettariiferi. Sono proterandri: la maturazione degli stami, sfasata nel tempo, avviene prima di quella dei pistilli (Escaravage et al., 2001). Presenta dimorfismo a livello degli stami, che possono essere corti al di sotto o allo stesso piano dello stilo e lunghi, al di sopra, formanti due distinti verticilli (Escaravage et al., 2001). Hanno ovario supero e le antere sono deiscenti per un poro apicale.

Il calice, tubuloso con cinque dentelli apicali, è lungo 1,5 mm, mentre la corolla è dapprima tubulare, poi imbutiforme-campanulata e lunga 1-1,5 cm. Il frutto è una capsula ovoidale, pentaloculare (Della Beffa, 1998).

Rhododendron ferrugineum si riproduce per via sia sessuale che asexuale. La riproduzione sessuale è importante in quanto permette uno scambio genico e consente quindi il rimescolamento dei caratteri ereditari, con il conseguente aumento di variabilità genetica all'interno delle popolazioni. Al contrario una riproduzione di tipo vegetativa, attraverso la produzione di stoloni prodotti dalla pianta madre porta alla formazione di individui e popolazioni clonali.

Studi rivelano che la riproduzione per via vegetativa avviene soprattutto in popolazioni chiuse con un'età di 50-60 anni (Escaravage et al., 1998), mentre la riproduzione sessuale può essere sia allogama che autogama (Escaravage et al., 1997). Nella riproduzione allogama avviene scambio pollinico tra fiori differenti, grazie alla presenza di insetti impollinatori ed in particolare di alcuni ditteri, api, coleotteri e lepidotteri (Escaravage e Wagner, 2004) che permettono la dispersione del polline; al contrario, nella riproduzione autogama il polline che feconda l'ovulo appartiene allo

stesso fiore. Questa tipologia di riproduzione si pensa sia un adattamento alle drastiche condizioni climatiche e all'insufficienza di insetti impollinatori.

Uno studio sulla morfologia del fiore (Escaravage et al., 1997) ha rivelato la presenza di caratteri che dimostrano sia autogamia, sia allogamia (impollinazione incrociata). La proterandria, l'impollinazione entomofila, la produzione di numerosi fiori, ovuli e polline, la presenza di nettari e di stami lunghi confermano l'impollinazione incrociata. Invece, la forma dei petali, il calice tubuloso e la posizione dello stilo, allo stesso livello degli stami più corti, suggeriscono autoimpollinazione (Escaravage et al., 1997). Inoltre, a dimostrazione dei vari ed efficienti sistemi riproduttivi di *Rhododendron ferrugineum* è stata osservata, nelle popolazioni più chiuse e mature (Escaravage et al., 1997), anche un particolare tipo di riproduzione vegetativa simile alla propaggine, che avviene quando un ramo, allungandosi, si curva verso il suolo. Se una porzione di questo viene coperta di terreno e si formano radici avventizie, allora il ramo diviene indipendente (Pornon et al., 1997). In questi casi *Rhododendron ferrugineum* può divenire specie dominante e giocare un importante ruolo nello strutturare la vegetazione, creando distese dense dove gli individui possono raggiungere un'età di 150 anni e oltre (Schlüssel, 2000). La fioritura è limitata ad un periodo molto breve. Per questo motivo tutti gli organi riproduttivi si preformano l'anno precedente. Anche se questa pianta cresce oltre il limite degli alberi dove le temperature possono facilmente scendere sotto zero il rischio di congelamento delle gemme viene evitato grazie alla presenza del manto nevoso che ricopre l'arbusto e protegge le gemme dal congelamento.

Areale

Rhododendron ferrugineum L. è una specie orofita ad ampio areale. La sua distribuzione geografica si estende dalle catene montuose dei Pirenei, su tutto l'arco Alpino e sull'Appennino settentrionale, che ne costituisce il limite meridionale. Nelle Alpi è attualmente distribuito su vaste aree, Negli Appennini si ritrova solo in alcuni siti dell'Appennino settentrionale, nel distretto Tosco-Emiliano (Figura 3.4).

È una specie distribuita su suoli acidi e umidi, ricchi di humus, prevalentemente su rocce silicee, e colonizza soprattutto i macereti e le praterie oltre il limite degli alberi sui pendii esposti a nord, ovest e nord-ovest, dove la neve si mantiene più a lungo. In tali ambienti, sopra al limite delle foreste, può formare estese brughiere d'altitudine assieme ai mirtilli (*Vaccinium myrtillus*, *V. gaultherioides*, *V. vitis-idea*) e ad *Empetrum hermaphroditum* (Ellenberg, 1963). Sulle Alpi questa vegetazione – il cosiddetto rodoro-vaccinieto – caratterizza la fascia (subalpina) immediatamente sovrastante il limite altitudinale degli alberi, a quote comprese tra 1900 e 2200 m. Da qui risale fino

a 2300 m ed oltre. I siti più elevati sono sui grandi massicci che circondano le valli aride a clima continentale. Nelle zone prealpine a clima oceanico, soprattutto nell'Insubria, *Rhododendron ferrugineum* discende fino ai fondivalle: in Val Sassina, nel Canton Ticino (sul M. Ceneri fino a 230 m), sul lago Maggiore e presso Ivrea (fino a 300-350 m). In queste stazioni diviene pianta sciafila, caratteristica dei castagneti più densi.

Sull'Appennino essa invece è rarissima e limitata alle vette più elevate del distretto Tosco-Emiliano, dal Parmense al Modenese dove rappresenta un relitto glaciale.

La distribuzione appenninica, compresa tra quote di 1800 e 2000 m, è nota grazie ai contributi di Ferrarini (1973; 1974; 1979; 1982), che indicò 6 siti, e afferma di aver cercato il rododendro in tutto l'Appennino Tosco-Emiliano compreso tra il M. Orsaro e il Corno alle Scale e di averlo cercato invano anche sulle Apuane.

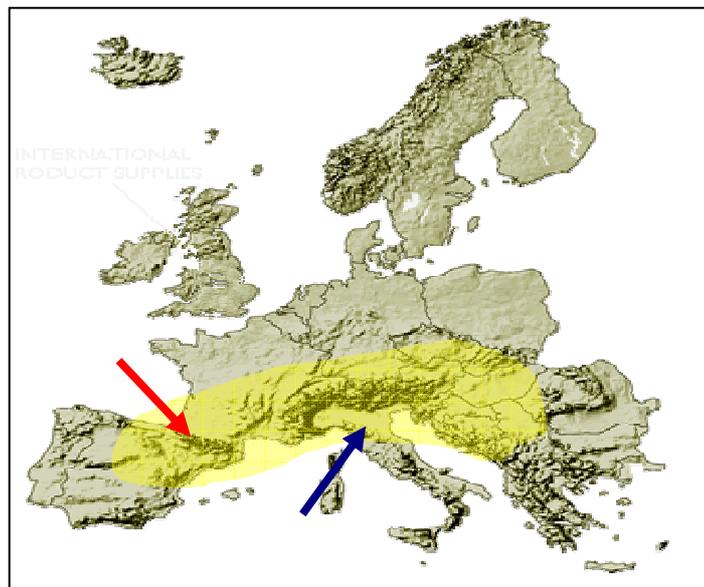


Figura 3.4 Areale di *Rhododendron ferrugineum*; la freccia rossa indica il limite occidentale (Pirenei) mentre la freccia blu indica il limite meridionale (Appennino toско-emiliano).

I siti indicati da Ferrarini sono stati di recente monitorati da Alessandrini e Bonafede (1996) che hanno confermato soltanto 5 siti situati su tre gruppi montuosi: Libro Aperto, M.Prado-Vecchio, Cima Belfiore.

Per la sua rarità in ambito appenninico, *Rhododendron ferrugineum* è specie inclusa nella legge 2/1977 della Regione Emilia-Romagna e nella legge 56/2000 della Regione Toscana e (Alessandrini et al., 2003). È inoltre inserita nella Lista Rossa dell'Emilia-Romagna ed in quella della Toscana

(Conti et al., 1997), nella categoria VU (vulnerabile). Nel 2004 *Rhododendron ferrugineum* L. è stato segnalato per la prima volta nelle Alpi Apuane, in una stazione con caratteristiche molto diverse rispetto a quelle delle vicine stazioni appenniniche (Ansaldi et al., 2004).

Un carattere comune, che si ritrova lungo tutta la sua area di distribuzione, è la crescita sui versanti con esposizione a nord caratterizzati da scarsa insolazione anche durante l'estate. Questa peculiarità si deve ricollegare alla presenza della neve. Infatti precipitazioni di carattere nevoso hanno un ruolo molto importante per la sopravvivenza e la riproduzione di questo arbusto: il manto nevoso ricoprendo totalmente le piante funge da isolante termico contro le basse temperature ed evita il rischio di congelamento delle gemme.

Attualmente l'areale del *Rhododendron ferrugineum* L. si sta lentamente riducendo sia per cause naturali che antropiche. Tra le cause naturali si riscontra una diminuzione delle precipitazioni nevose che portano al congelamento delle gemme. La perdita di gemme porta ad una diminuzione della proliferazione per via sessuale con conseguente aumento della riproduzione vegetativa e aumento di popolazioni clonali con una riduzione quindi della variabilità genetica. La diminuzione del rododendro è dovuta anche a cause antropiche: la raccolta indiscriminata dei fiori compromette la riproduzione e l'integrità delle piante stesse; inoltre, per fare spazio a pascoli ed evitare che animali da allevamento, come capre e pecore, possano rimanere avvelenate dall'ingestione di questa pianta, molti allevatori l'hanno estirpata.

3.2 *Rhododendron hirsutum* L.

Rhododendron hirsutum L. è una specie sempreverde con habitus arbustivo e cespuglioso.



Figura 3.5 Foglia di *Rhododendron hirsutum* L. (pagina inferiore).

Le foglie (Figura 3.5) sono bifacciali, semplici ed ovoidali, ma a differenza di *Rhododendron ferrugineum* L., non hanno alcuna ghiandola per estrarre il ferro. Presentano invece una serie di ciglia che percorrono l'intero margine della foglia e, sulla pagina inferiore, delle ghiandole puntiformi bianco-brune. I fiori del *Rhododendron hirsutum* L., ermafroditi, attinomorfi, singoli o raggruppati in infiorescenze, sono di colore rosa-giallo e poco profumati. Anche in questo caso la riproduzione può essere asessuata o sessuata, con modalità simili a quelle di *Rhododendron ferrugineum* L.

Areale

Specie endemica alpina (a tendenza orientale), può essere osservata fra gli 800 e i 2200 m di altitudine, con rare presenze anche a quote più basse, specialmente su ghiaioni e macereti ove si comporta come pianta pioniera (Figura 3.6). Questa specie predilige terreni basici, calcarei, soprattutto ghiaioni e macereti appena consolidati. *Rhododendron hirsutum* L. si comporta spesso da specie pioniera ed a differenza di *Rhododendron ferrugineum* L. preferisce aree soleggiate (Della Beffa, 1998).

Anche *Rhododendron hirsutum* L. è raro e protetto: rientra infatti anch'esso nei piani di conservazione floristica di diverse regioni italiane.



Figura 3.6 Areale di *Rhododendron hirsutum* L.

Probabilmente l'isolamento riproduttivo fra le due specie non è completo, in quanto sono stati segnalati ibridi (*Rhododendron x intermedium* Tausch) nelle zone di sovrapposizione arealica (Alessandrini et al., 2003).

3.3 *Rhododendron x intermedium* Tausch

Rhododendron ferrugineum L. e *Rhododendron hirsutum* L. possono generare l'ibrido fertile *Rhododendron x intermedium* Tausch. L'individuazione di questo ibrido e la sua classificazione sono successive a quelle delle specie parentali e si devono agli studi di Tausch.

Rhododendron x intermedium si presenta come arbusto cespuglioso sempreverde e presenta caratteristiche intermedie tra le due specie parentali.

L'aspetto della foglia varia notevolmente da individuo ad individuo: essa infatti può presentare bordo più o meno cigliato e ghiandole ferruginee in proporzioni differenti. Spesso una semplice analisi morfologica può non essere sufficiente a catalogare un individuo come appartenente all'ibrido *Rhododendron x intermedium* Tausch poiché può essere confuso con uno dei due parentali. Questo ibrido in grado di riprodursi sia con gli altri ibridi, sia con entrambi i parentali (fenomeno dell'introgresione). Può vivere su terreni con maggiori differenze di pH rispetto alle due specie parentali, il che denota una maggiore tolleranza ecologica.

Areale

Rhododendron x intermedium Tausch è diffuso sulle Alpi, nelle zone in cui esiste coesistenza delle due specie parentali (Figura 3.7) In Italia possiamo trovarlo su Monte Piana, nel Bormiese e sulla Grigna settentrionale in Valsassina. In Austria è stata documentata la sua presenza sul Monte Burgstall (Milne, 2008).

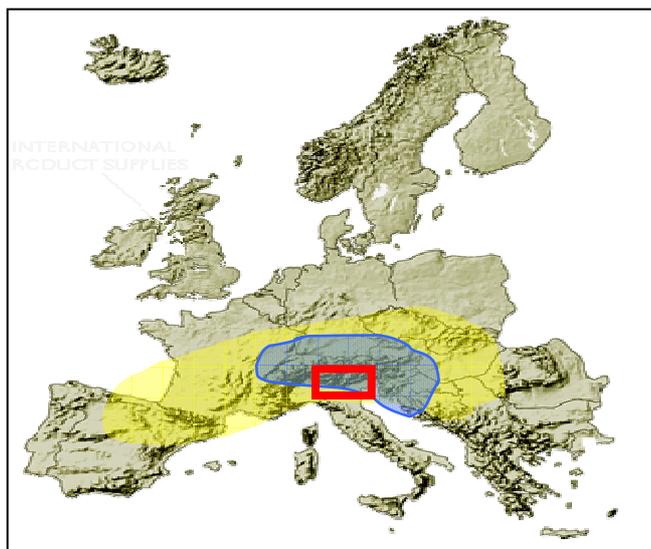


Figura 3.7 Areali di *Rhododendron ferrugineum* L. (in giallo) e *Rhododendron hirsutum* L. (in blu) e zone in cui è accertata la presenza dell'ibrido (riquadro)

Capitolo 4

Il fenomeno dell'ibridazione

La rottura delle barriere riproduttive responsabili della formazione e della differenziazione delle specie è un fenomeno abbastanza comune in natura e determina un rimescolamento dei pool genici delle specie parentali.

Nel regno animale l'ibridazione è spesso impedita da meccanismi di isolamento riproduttivo che prevengono l'accoppiamento tra individui appartenenti a specie diverse. Nel regno vegetale invece, l'incontro tra gameti di specie diverse è un fenomeno molto più comune e l'ibridazione è generalmente evitata grazie a meccanismi di isolamento postimpollinazione.

L'idea che gli ibridi fossero sempre caratterizzati da bassi livelli di fertilità e di vitalità ha portato per lungo tempo ad una sottovalutazione del ruolo evolutivo dell'ibridazione (Mayr, 1963, 1992; Wagner, 1969, 1970; Barton e Hewin, 1985). Ciononostante, molti dati di letteratura suggeriscono un importante ruolo di tale fenomeno nei processi di speciazione. Secondo alcuni autori, particolarmente quelli di estrazione zoologica, l'ibridazione costituirebbe una sorta di “rumore di fondo” nei processi di speciazione (Mayr, 1992; Schemske, 2000). Secondo altri, di estrazione botanica, l'ibridazione potrebbe, invece, aver avuto un'importante funzione evolutiva e potrebbe aver giocato un ruolo determinante in molti casi di speciazione (Anderson, 1949; Arnold, 1997; Rieseberg e Carney, 1998; Rieseberg e al., 2003). Si ritiene, infatti, che molte specie vegetali possano essere di origine ibridogena (Ellstrand e al., 1996; Rieseberg, 1997) e secondo alcune stime (Stace, 1987), sembra che il 50-70% delle Angiosperme attualmente esistenti possa essersi originato in seguito ad ibridazione.

Le conseguenze evolutive dell'ibridazione possono essere molteplici (Stebbins, 1959) e molte ricerche sono state condotte con lo scopo di comprendere i possibili scenari evolutivi che gli eventi di ibridazione possono produrre.

L'introggressione, descritta da Anderson e Hubricht (1938) come il principale risultato dell'ibridazione, è stata anche definita come l'incorporazione di materiale genetico, proveniente da una specie, nel pool genico di un'altra. Questo fenomeno naturale può portare alla fusione delle specie parentali (*disintegrazione genetica*; O'Brien e Mayr, 1991), ma può anche favorire gli incontri con specifici ed incrementare l'isolamento riproduttivo (*reinforcement*; Howard, 1986).

Inoltre, l'introggressione può consentire il trasferimento di materiale genetico tra le specie, facilitando potenzialmente l'evoluzione adattativa e di conseguenza la formazione di una nuova specie, il cui genotipo è capace di colonizzare nuovi habitat (Lewontin e Birch, 1966).

In casi di introggressione molto spinta, i geni possono muoversi attraverso i confini che delimitano le specie parentali. Anderson (1949) è stato il primo a comprendere la funzione degli ibridi come ponte per lo scambio di caratteri adattativi tra le specie. Più recentemente, Martinsen e al., (2001) hanno suggerito che gli ibridi possano agire come filtro evolutivo, lasciando passare solo geni vantaggiosi e prevenendo l'introggressione di quelli negativi. Il processo di introggressione di caratteri adattativi sembra pertanto essere il principale contributo evolutivo dell'ibridazione nelle piante (Anderson, 1949; Lewontin e Birch, 1966).

La potenziale funzione creativa dell'ibridazione dipende tuttavia, in modo determinante, dal successo riproduttivo dell'ibrido (Arnold e Hodges, 1995). La maggior parte degli ibridi, anche se capace di produrre una prole fertile, mostra un successo riproduttivo più basso rispetto a quello delle specie parentali. Il genotipo ibrido è infatti il risultato della fusione dei genotipi delle specie parentali e pertanto non ha subito l'azione adattativa della selezione naturale. Tuttavia, occasionalmente, il genotipo ricombinante può essere in grado di adattarsi meglio dei parentali ad alcuni ambienti (Anderson, 1948; Moore, 1977; Arnold, 1997).

In generale, si ritiene che la vitalità e la fertilità degli ibridi di prima generazione siano più basse di quelle dei parentali a causa della rottura dell'associazione genica tra loci coinvolti nell'adattamento (Dobzhansky, 1937). Questa ipotesi è stata confermata soprattutto per le specie che presentano forti barriere postimpollinazione ed è stata verificata in *Heliantus* (Heiser, 1947), *Layia* (Clausen, 1951), *Gilia* (Grant, 1966) e *Oryza* (Li e at., 1997).

Il fatto che generalmente gli ibridi mostrino un basso successo riproduttivo, tuttavia, non esclude la possibilità che alcuni genotipi ibridi possano avere una fitness uguale o maggiore di quella delle specie parentali. Recenti lavori hanno descritto situazioni nelle quali una piccola quantità di individui di origine ibridogena erano in grado di superare il successo riproduttivo delle specie parentali nel loro stesso ambiente (Barton, 2001).

Una significativa associazione genotipo-ambiente è stata osservata in sciame di ibridi che si trovavano in ambienti diversi da quelli dei parentali. Presumibilmente ciò indica che ci possa essere una selezione positiva per il genotipo ibrido quando si trova in un ambiente ad esso favorevole (Stebbins e Daly, 1961; Potts e Reid, 1985; Cruzan e Arnold, 1993, 1994; Arnold, 1997). In questo

caso, dunque, l'ibrido può occupare una differente nicchia ecologica e generare una nuova linea evolutiva.

Da quanto detto, appare chiaro che l'ibridazione può rappresentare un'importante forza evolutiva nel regno vegetale (Rieseberg, 1997), e pertanto le zone di ibridazione sono state utilizzate da molti ricercatori per studiare il processo della speciazione (Barton e Hewitt, 1985; Burke e Arnold, 2001; Rieseberg et al., 2002).

Fino a pochi anni fa, lo studio delle zone di ibridazione e la stima degli effetti dell'introgresione in popolazioni naturali, basandosi esclusivamente su analisi morfometriche, non avevano prodotto risultati significativi. Recentemente, invece, l'applicazione di marcatori molecolari genetici ha notevolmente facilitato gli studi sull'ibridazione e sull'introgresione consentendo alla ricerca di fare notevoli avanzamenti nella comprensione dell'architettura genetica delle zone di ibridazione.

Gli strumenti d'indagine

Capitolo 5

I marcatori molecolari

L'utilizzo di tecniche molecolari per studiare la vite e le relazioni tra le diverse sottospecie, come già sottolineato, sembra essere lo strumento più idoneo per chiarire le dinamiche ed i tempi che hanno interessato il fenomeno della domesticazione grazie allo sviluppo di metodologie sempre più raffinate. L'analisi molecolare si basa sullo studio di due principali tipi di molecole: proteine e DNA. I marcatori proteici si basano soprattutto sull'analisi di isoenzimi, proteine enzimatiche legate al metabolismo primario e secondario, che differiscono, da individuo ad individuo, nella struttura primaria. Queste differenze sono facilmente identificabili tramite elettroforesi su gel. Altra caratteristica di questi marcatori è la co-dominanza che permette di distinguere individui omozigoti da individui eterozigoti. I limiti di questa tecnica risiedono nel fatto che solo la parte codificante del DNA viene esplorata; inoltre le proteine candidate per questo tipo di analisi non sono molto numerose, e spesso i soli dati isoenzimatici non risultano sufficienti. I marcatori proteici sono stati gli unici marcatori molecolari disponibili fino alla fine degli anni '70. Attualmente sono stati affiancati, ma più spesso sostituiti da marcatori genetici. I marcatori molecolari del DNA sono basati sull'analisi di una o più regioni del DNA attraverso metodologie più o meno casuali e più o meno complesse. Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico rilevabile tramite sonde (probe) o inneschi (primer) specifici che, a causa della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico e inequivocabile il tratto cromosomico con cui si identifica e che la circonda (Barcaccia et al., 2000). Per la loro natura, quindi, questi strumenti d'indagine si basano direttamente sulla rilevazione di differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del genoma di ogni individuo causate da fenomeni di inserzione, delezione, traslocazione, duplicazione, mutazioni puntiformi, ecc. Le caratteristiche che rendono i marcatori molecolari del DNA ottimi strumenti di analisi possono essere così riassunte:

- 2 Non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, trattandosi di differenze a livello della molecola di DNA
- 3 Sono distribuiti in tutto il genoma, trascritto e non, quindi possono contraddistinguere anche regioni introniche e regioni di regolazione, permettendo di rilevare differenze tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili

- 4 Non presentano effetti depistatici, o pleiotropici ed in molti casi hanno espressione co-dominante, consentendo così di distinguere la condizione di eterozigosi da quella di omozigosi

Di contro però un buon marcatore molecolare deve possedere quattro requisiti fondamentali:

- 2 Un elevato grado di polimorfismo, che ne aumenti la capacità di discriminare le diverse cultivar
- 3 Segregazione mendeliana
- 4 Neutralità selettiva: il marcatore non deve essere legato a caratteri che possono subire selezione, perché questo potrebbe creare distorsioni
- 5 Facilità ed economicità nell'isolamento e nell'impiego delle tecniche che consentono il loro rilevamento

I marcatori molecolari attualmente disponibili sono numerosi e costituiscono strumenti molecolari di indagine estremamente efficaci ed affidabili, che trovano larga applicazione sia nella ricerca genetica che in quella applicata. Alcuni tipi di marcatori, come RFLP e VNTR (minisatelliti), sono basati sul procedimento di ibridazione tipo "Southern" (Southern Blot Hybridization, SBH), mentre altri, RAPD, o AP-PCR, SSR (microsatelliti), I-SSR e AFLP (SAMPL, S-SAP), sono basati sulla "Reazione a Catena della Polimerasi" (PCR, Polimerase Chain Reaction) (Figura 5.1). In ogni caso, un marcatore molecolare costituisce un marcatore genico, che può essere descritto come un frammento di DNA cromosomico, di dimensione variabile, generalmente da 50 a 3000 bp, compreso tra due regioni oligonucleotidiche note di 6930 bp (Gupta et al., 1996; Vendramin e Ziegenhagen, 1997; Barcaccia et al., 2000). Le sequenze laterali sono infatti quelle riconosciute dagli enzimi di restrizione, nel caso di RFLP e VNTR, oppure dagli inneschi della DNA polimerasi, nel caso di RAPD, SSR e I-SSR, oppure da entrambi, negli AFLP. La sequenza centrale del marcatore, invece, è totalmente, o parzialmente nota e coincide con la sequenza della sonda, nel caso di RFLP e VNTR, o con la sequenza ripetuta, nel caso di SSR, mentre è ignota nel caso di RAPD (AP-PCR), I-SSR e AFLP (SAMPL, S-SAP).

Tra tutte queste tecniche è inoltre possibile un'ulteriore distinzione tra:

- Marcatori "multi-locus", basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici, che implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (ad es. RAPD, AFLP)

- Marcatori “singolo locus” che, invece, prevedono l’ibridazione o l’amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota, mediante l’utilizzo di sonde, o inneschi, specifici per determinati loci genomici (ad es. RFLP, SSR, STS).

I primi sono pertanto marcatori di tipo dominante, nel senso che, ad ogni locus, si può evidenziare la presenza, o l’assenza, della banda, ma non è possibile distinguere la situazione eterozigote a/- da quella omozigote per lo stesso allele marcatore a/a, mentre i secondi sono marcatori di tipo co-dominante, permettendo di distinguere i loci omozigoti a/a e b/b da quello eterozigote a/b, rappresentati, rispettivamente, da una sola banda (l’uno o l’altro allele) e da due diverse bande (entrambi gli alleli marcatori).

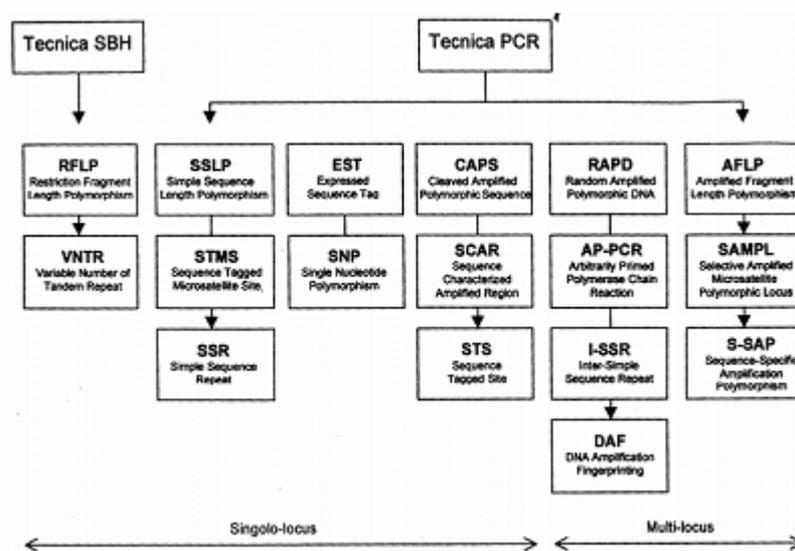


Figura 5.1 Principali classi di marcatori impiegati nell’analisi genomica suddivisi per tecnica utilizzata (SBH-PCR) e per numero di loci saggiati (Barcaccia et al., 2000).

5.1 I marcatori molecolari microsatelliti (SSR)

Con l’avvento della “Reazione a Catena della Polimerasi” da parte di Mullins (1987), nasce una nuova era anche nel settore dei marcatori molecolari; in questo contesto l’introduzione della PCR consente innanzitutto di analizzare e confrontare tra loro un gran numero di campioni, con relativo abbattimento di costi e tempo e permette, tra l’altro, di lavorare ottenendo ottimi risultati anche con una quantità iniziale di DNA estremamente ridotta. La Polimerase Chain Reaction è un metodo che consente di sintetizzare ripetutamente, cioè di amplificare in vitro e per via enzimatica uno o più specifici segmenti di DNA situati tra due sequenze nucleotidiche note, producendone un numero elevato di copie, attraverso una serie di reazioni di denaturazione del DNA, ibridazione degli

inneschi, o primer, e polimerizzazione dei nuovi filamenti (Gupta et al., 1996; Vendramin e Ziegenhagen, 1997; Barcaccia et al., 2000).

I microsatelliti, o SSR (Simple Sequence Repeats), sono sequenze ripetute di DNA non codificante costituite da unità di ripetizione molto corte (da 2 a 5 paia di basi) presenti molto frequentemente all'interno del genoma; se ne stima, in media uno ogni 509750 Kb (Gupta et al., 1996; Vendramin e Ziegenhagen, 1997; Barcaccia et al., 2000). La ricerca dei polimorfismi, alla base di questo tipo di tecnica, avviene utilizzando la PCR con l'ausilio di primer specifici disegnati in modo da essere complementari alle regioni che fiancheggiano le sequenze ripetute e che risultano essere altamente conservate e specifiche del genere e della specie (Morgante e Olivieri, 1993). I primer così disegnati consentono di amplificare singoli microsatelliti, che possono differire tra individui, non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto. La funzione di queste zone nel genoma è ancora oggi poco nota. In particolare per quel che riguarda le ripetizioni situate nelle regioni codificanti, si pensa che esse possano avere un ruolo nella regolazione della trascrizione dei geni ad esse adiacenti. Per quanto riguarda gli SSR situati al di fuori delle regioni codificanti è verosimile che siano spaziatori tra i geni, e quindi non soggetti a pressioni selettive. Per tale motivo risultano estremamente variabili, divenendo marcatori particolarmente utili per caratterizzare gruppi o popolazioni in cui la variabilità non sia particolarmente alta, come ad esempio nella specie di interesse agronomico. La co-dominanza è una caratteristica altrettanto ricercata qualora si voglia risalire al pedigree di una determinata cultivar o definire legami di parentela all'interno di un gruppo varietale. Le informazioni circa i meccanismi responsabili del polimorfismo sono ad oggi poco chiari e le ipotesi più accreditate sono:

- Slittamento di due cromosomi omologhi al momento dell'appaiamento durante il processo di replicazione, favorito proprio dalla presenza di più sequenze ripetute identiche. La conseguenza più semplice di tale comportamento è rappresentato dalla inserzione o dalla delezione di una o più unità ripetute nel corso della sintesi del DNA complementare (Wolff et al., 1989; Schlotterer e Tautz, 1992)
- Eventi di ricombinazione mitotica e meiotica, quali ad esempio crossing-over ineguale tra cromosomi omologhi alla meiosi, il cui risultato può consistere in variazioni che interessano anche un elevato numero di sequenze ripetute (Ashley e Warren, 1995)
- Azione combinata dei due meccanismi mutageni descritti (Di Renzo et al., 1996).

Si sottolinea che l'utilizzo dei microsatelliti trova largo impiego nella costruzione di mappe genetiche, grazie alla sua natura co-dominante sia in ambito animale che vegetale (Broun, 1993; Becker, 1995; Vezzulli et al., 2008), negli studi di dinamica di popolazione, nel clonaggio di nuovi geni (Akagi, 1997) e negli studi di filogenesi (Grassi et al., 2006).

5.2 I marcatori molecolari filogenetici

Grazie alla loro universalità ed affidabilità, i geni plastidiali e nucleari (matK: Hilu et al., 2003; psbA-trnH: Storchova, 2007; ITS: Soltis et al., 1997, 2000) sono i marcatori più utilizzati nei più recenti studi sull'ibridazione, la poliploidia, l'evoluzione, la speciazione e la domesticazione delle specie vegetali. I DNA plastidiale e nucleare non sono risultati però sufficientemente variabili dal punto di vista evolutivo, per ottenere dei buoni risultati in questi tipi di analisi (Despres et al., 2003, Pelsner et al., 2003; Hughes et al., 2006). Per questi motivi sono stati identificati negli ultimi anni nuovi geni in particolare per gli studi di ricostruzione filogenetica, soprattutto per risolvere i casi di incongruenza tra DNA plastidiale e DNA nucleare. Esempi di questi nuovi geni sono i cosiddetti geni COS (Conserved Ortholog set). In questo lavoro il gene COS preso in considerazione è il gene nucleare At103.

ITS

Il DNA nucleare codificante per gli RNA ribosomali (rDNA) è stato ampiamente impiegato negli studi di filogenesi, grazie al suo elevato grado di conservatività. L'rDNA 18S, ad esempio, costituisce una delle regioni di DNA più conservate ed è stato impiegato per ricostruire complessi rami filogenetici che includono regni, phyla, classi ed ordini. Le regioni ITS (intergenic transcribed spacer) invece, sono mediamente variabili e con un indice di conservazione adeguato per indagini a livello di piccole famiglie e di grandi generi (Suh et al., 1993; Kim e Jansen, 1994; Baldwin et al., 1995). Oltre all'appropriato tasso di variabilità, gli ITS presentano anche vantaggi di natura sperimentale: essi, infatti, appartengono al DNA ribosomale nucleare, che costituisce una frazione abbondante del DNA totale, inoltre sono compresi tra regioni di DNA altamente conservate (il 18S, il 5,8S e il 25S); entrambe le caratteristiche 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. Queste caratteristiche della regione ITS la rendono un buon candidato per il DNA barcoding (Chen, 2010)(Figura 5.2).

L'intera regione ITS, compresa la subunità 5.8S, è stata amplificata.

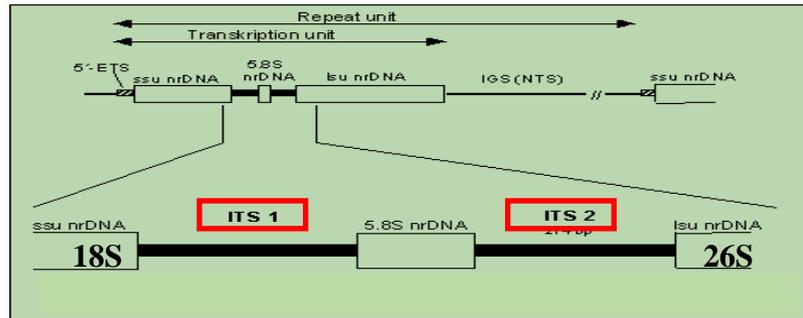


Figura 5.2 La regione ITS

At103

Recentemente, grazie al completo sequenziamento del genoma di alcuni organismi ed all'aumento sempre più significativo di EST (Expressed Sequence Tags), è stato possibile individuare un set di geni ortologhi conservati (COS). I geni ortologhi sono quei geni che si sono evoluti, in specie diverse, da un gene ancestrale comune; questi sono quindi tanto più simili quanto più le specie sono evolutivamente vicine. Il fenomeno della speciazione porta alla divergenza dei geni e quindi delle proteine che essi codificano.

Confrontando le sequenze genomiche di Arabidopsis con la banca dati EST di pomodoro sono stati individuati 1025 geni COS; questi rappresentano geni funzionali che mostrano un elevato grado di conservazione all'interno di tutte le Dicotiledoni (Fulton et al., 2002).

È facile intuire come questi marcatori possano essere utili per stabilire le relazioni filogenetiche all'interno di specie e generi (http://cgpdb.ucdavis.edu/COS_Markers/COS_Markers.html).

Il gene COS At103 (Li et al., 2008) (Figura 5.3) codifica per l'enzima Mg-protoporfirina IX monometil ester ciclasi che appartiene alla classe delle ossidoreduttasi e partecipa alla biosintesi della clorofilla.

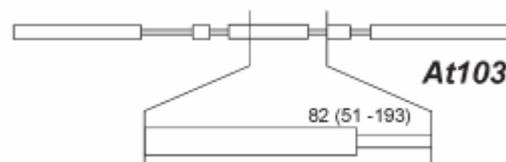


Figura 5.3 Posizione del gene COS At103 rispetto al DNA genomico di Arabidopsis thaliana. I numeri indicano la lunghezza dell'introne corrispondente all'allineamento.

psbA-trnH

La regione spaziatrice *psbA-trnH* è una delle regioni più variabili del genoma plastidiale (Shaw et al., 2007) ed è localizzata a valle dell'introne *trnK* che include il gene *matK*.

La regione *psbA* a valle è trascritta; una TATA box è seguita da un loop nella struttura secondaria dell'RNA che ha il compito di codone di stop per la proteina codificata da *psbA* (Figura 5.4). Questa parte non tradotta (UTR) è lunga circa 28-70 bp nelle Angiosperme ed è seguita da una parte non trascritta molto variabile di lunghezza molto diversa da pianta a pianta (da 200 a più di 1000 bp).

Proprio per questa sua grande variabilità, lo spaziatore *psbA-trnH* può raggiungere alti livelli di discriminazione tra specie e quindi essere un buono strumento per le analisi di tipo filogenetico.

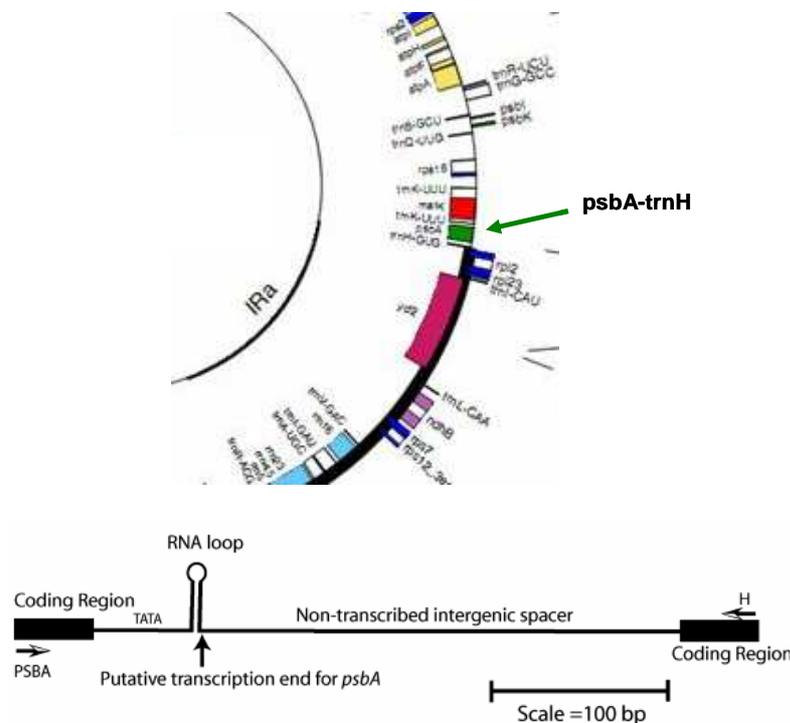


Figura 5.4 Rappresentazione schematica della regione intergenica *psbA-trnH* nelle Angiosperme dicotiledoni.

matK

Il gene *matK* codifica per la maturasi K, coinvolta nella sintesi delle proteine vegetali.

La regione amplificata è circa di 1000 bp e si trova all'interno dell'introne del gene cloroplasti dico *trnK*, nella sezione adiacente alla ripetizione invertita (Figura 5.5).

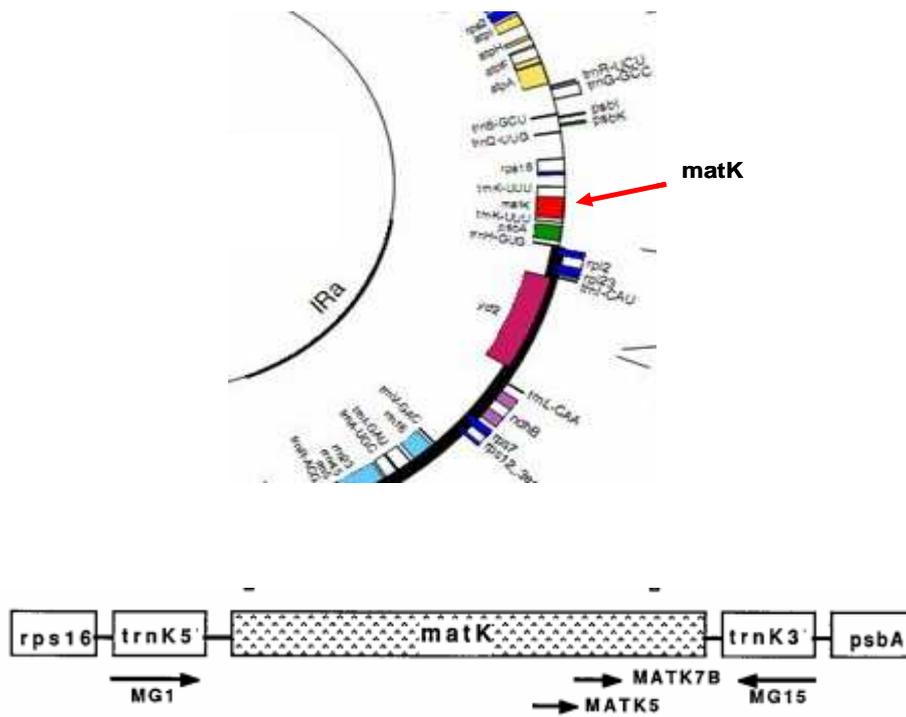


Figura 5.5 Rappresentazione schematica della regione genica *matK*.

Materiali e metodi

Capitolo 6

Campionamento

6.1 Raccolta e conservazione dei campioni

Per le specie allogame risulta essere rappresentativa una popolazione composta da 10-50 individui (Center for Plant Conservation, 1986). Per questa ragione il campionamento di ogni popolazione si è basato sulla raccolta di almeno 10 individui. Nei casi in cui non era possibile - per numero degli individui sotto le 10 unità s- i è proceduto a campionare il massimo numero di individui possibile. E' stato essenziale considerare una distanza minima tra un individuo e l'altro (circa 2 metri) al fine di minimizzare la raccolta di esemplari clonali (si ricorda infatti che la specie si riproduce anche per via vegetativa). Per ogni accessione sono state raccolte almeno 2 foglie e 2 gemme in appositi contenitori monouso (Figura 6.1) indicanti le caratteristiche della popolazione e del singolo individuo. Ogni sito di campionamento è stato georeferenziato.

I campioni sono stati conservati congelandoli a -20°C oppure essiccandoli con gel di silice. Entrambe le modalità di conservazione non hanno evidenziato problemi durante l'estrazione del DNA.

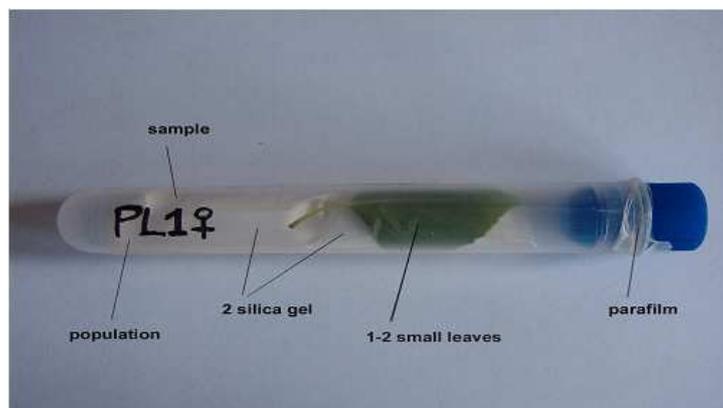


Figura 6.1 Provetta per il campionamento

6.2 Popolazioni campionate

Obiettivo I

Sono state campionate le seguenti 27 popolazioni di *Rhododendron ferrugineum* :

- le sole 3 popolazioni rimaste nell' Appennino tosco-emiliano,
- 6 popolazioni nelle Alpi Marittime (3 nel versante italiano e 3 nel versante francese),
- 12 popolazioni nelle Alpi centro-orientali,
- 6 popolazioni nei Pirenei (1 nel versante francese e 5 nel versante spagnolo).

per un totale di 395 individui. Nella Figura 6.2 sono indicate tutte le popolazioni campionate. L'elenco delle popolazioni, le coordinate geografiche, l'altitudine e il numero di individui raccolti per ogni popolazione sono indicati nella Tabella 6.1.

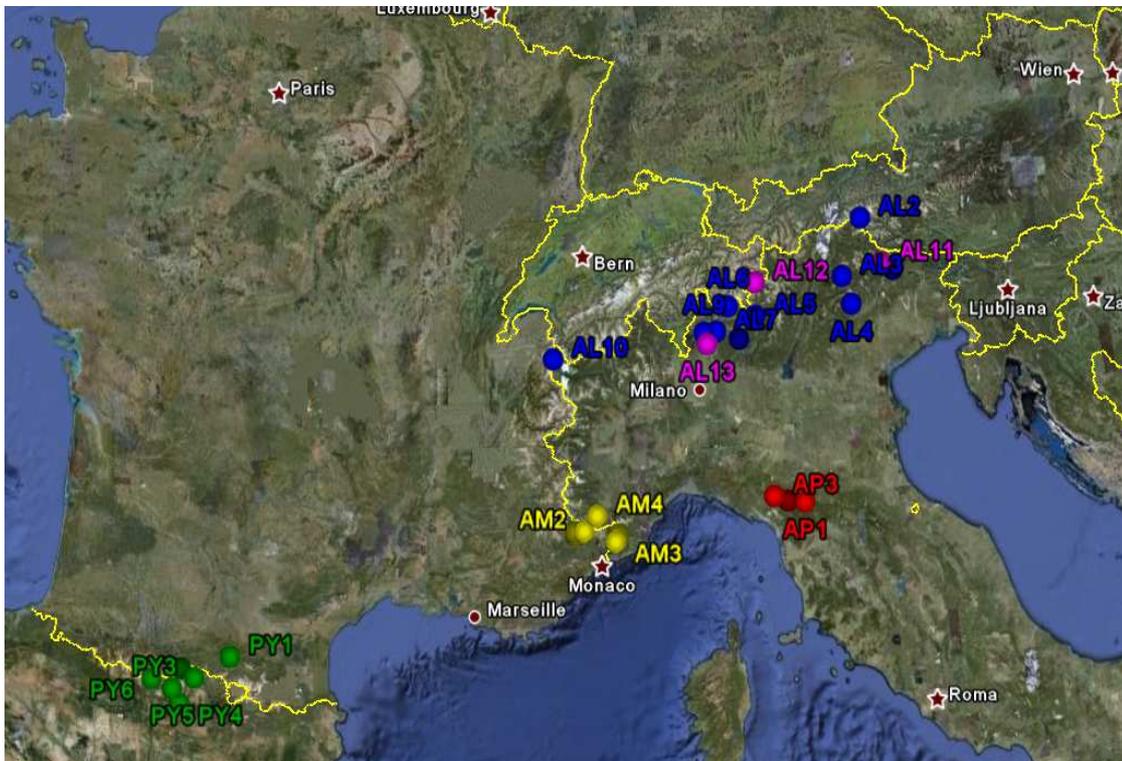


Figura 6.2 Distribuzione dei siti di campionamento di *R. ferrugineum* e *R. x intermedium*.

(In rosso sono indicate le popolazioni degli Appennini; in giallo sono indicate le popolazioni delle Alpi Marittime; in blu sono indicate le popolazioni delle Alpi centro-orientali; in verde sono indicate le popolazioni dei Pirenei e in fucsia sono indicate le popolazioni dove sono state campionate le tre specie di rododendro presenti).

Obiettivo II

Le popolazioni di *Rhododendron x intermedium* Tausch sono state campionate in 3 siti segnalati da Pignatti (1982). In questi siti, oltre a *Rhododendron x intermedium*, sono stati campionati anche individui di *Rhododendron ferrugineum* e di *Rhododendron hirsutum*, se presenti. Il riconoscimento delle tre specie su campo è stato fatto –in accordo con le indicazioni delle Flore - soprattutto sulla base di caratteri fogliari. In particolare, spesso è risultato difficoltosa la distinzione tra *R. x intermedium* e *R. hirsutum* nelle aree in cui le due specie coesistono. Il riconoscimento di *R. ferrugineum* è risultato più semplice grazie alla presenza delle numerose ghiandole ferruginee nella pagina inferiore delle foglie. Per meglio effettuare le analisi è stata campionata anche una popolazione di *Rhododendron hirsutum* pura (nel sito di Mezzeno, AL14). Nei siti di Bormio e della Grigna settentrionale i campioni sono stati raccolti in 4 diverse aree in quanto, durante i

campionamenti, si è osservato che gli individui presentavano caratteristiche morfologiche diverse da una zona all'altra lasciando presupporre quindi la presenza di uno sciame ibrido. Complessivamente, nei 3 siti di campionamento (Monte Piana, Bormio e Grigna) sono stati raccolti 166 individui. Ogni individuo è stato poi identificato sia morfologicamente che geneticamente e sono stati ottenuti un totale di 108 individui appartenenti alla specie ibrida.

Nella Figura 6.3 sono evidenziate le popolazioni ibride campionate. L'elenco delle popolazioni, il dettaglio di ogni stazione, le coordinate geografiche, l'altitudine e il numero di individui raccolti sono elencati nella Tabella 6.2.



Figura 6.3 Dettaglio dei siti di campionamento di *R. x intermedium* nelle zone di Bormio (AL12) e della Grigna settentrionale (AL13).

Catena montuosa	Sito di campionamento	Coordinate geografiche	Altitudine (m.s.l.m.)	Numero campioni
Appennini	Monte Libro Aperto (AP1)	44°11' – 10°43'	2100	21
Appennini	Monte Prado-Vecchio (AP2)	44°13' – 10°27'	1906	10
Appennini	Monte Nuda-Cima Belfiore (AP3)	44°17' – 10°14'	1793	19
Alpi Marittime	Monte Saccarello, alta Val Tanaro (CN) (AM1)	44°03' – 07°43'	2100	10
Alpi Marittime	Colle delle Finestre Val Gesso (CN) (AM2)	44°07' – 07°21'	2125	12
Alpi Marittime	Monte Grai, Val Nervia (IM) (AM3)	43°59' – 07°40'	1800	11
Alpi Marittime	Lago delle Portette (AM4)	44°16' – 07°24'	1900	10
Alpi Marittime	Vallone di Fenestrelle- Bacino del Chiotas (AM5)	44°05' – 07°03'	2300	10
Alpi Marittime	Vallon de la Miniere-Lac de la Miniere (AM6)	44°07' – 07°02'	2090	10
Alpi	Col Marende- Casera Razzo (Belluno) (AL1)	46°28' – 12°36'	1805	16
Alpi	Heilig Geist- S.Spirito Valle Aurina (TN) (AL2)	47°03' – 12°10'	1600	23
Alpi	Campitello di Fassa, Val Duron Dolomiti (AL3)	46°28' – 11°44'	1860	14
Alpi	Passo Rolle (TN) (AL4)	46°10' – 11°50'	1950	10
Alpi	Monte Padrio (AL5)	46°10' – 10°13'	1858	20
Alpi	Alpe Zocche-Chiareggio (AL6)	46°18' – 09°47'	1750	20
Alpi	Pescegallo- Orobie Valtellinesi, Morbegno (AL7)	46°03' – 09°33'	1500	21
Alpi	Gromo- Laghi di Grabiasca (BG) (AL8)	45°57' – 09°55'	1730	20
Alpi	Paglio-Piano delle Betulle, Val Sassina (BG) (AL9)	46°03' – 09°21'	1795	20
Alpi	Lago Cornu-Chamonix (AL10)	45°55' – 06°52'	2200	11
Alpi	Monte Piana (BL) (AL11)	46°33' – 12°25'	1650	10
Alpi	Bormio (SO) (AL12)	46°31' – 10°16'	2000	23
Pirenei	Cirque de Campuls-Ariège (PY1)	42°56' – 01°30'	1800	20
Pirenei	Lerida Les Montludè (PY2)	42°48' – 00°42'	2300	12
Pirenei	Huesca Benasque Rio Mulleres Orillas del Lago (PY3)	42°42' – 00°55'	2345	10
Pirenei	Huesca Benasque Bajo La Renclusa (PY4)	42°25' – 00°40'	2010	10
Pirenei	Huesca Benasque Ibon de Gurgute (PY5)	42°35' – 00°33'	1850	12
Pirenei	Huesca Torla Quescaro Sierra de las Culas (PY6)	42°41' – 00°13'	1800	10

Tabella 6.1 Obiettivo I – *R. ferrugineum*. Siti di campionamento, coordinate geografiche e numero di individui raccolti in ogni sito. Tra parentesi le abbreviazioni utilizzate nel test.

Catena montuosa	Sito di campionamento	Coordinate geografiche	Altitudine (m.s.l.m.)	Numero campioni
Alpi	Monte Piana (AL11)*	46°33' – 12°25'	1650	13
Alpi	Bormio (AL12)*	46°31' – 10°16'	2000	56
Alpi	Grigna settentrionale (AL13)	45°56' – 9°23'	2400	39

Tabella 6.2 .Obiettivo II – *R. x intermedium*. Siti di campionamento, coordinate geografiche e numero di individui raccolti in ogni sito. Tra parentesi le abbreviazioni utilizzate nel testo (*queste due popolazioni sono in comune con le popolazioni di campionamento di *R. ferrugineum* in quanto sono state campionate entrambe le specie)

Capitolo 7

Analisi molecolari

7.1 Estrazione del DNA

Da tutti i campioni raccolti, sia partendo da materiale fresco, conservato a -20°C che da materiale secco, conservato in provette con gel di silice, è stato estratto il DNA.

La prima fase dell'estrazione prevede una lisi meccanica, previo congelamento dei campioni con azoto liquido, che può avvenire sia manualmente mediante l'utilizzo di pestello e mortaio, che in modo automatico mediante lo strumento "TissueLyser"(Qiagen, Italia) che frantuma il campione grazie a delle sfere di acciaio inox rendendolo omogeneo. Questa prima fase è indispensabile in quanto le cellule vegetali presentano, oltre alla membrana plasmatica, anche una spessa parete cellulare che deve essere rimossa. Il materiale vegetale liso meccanicamente è stato quindi utilizzato per l'estrazione del DNA mediante il kit commerciale DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Italia) che prevede un'ulteriore fase di lisi chimica mediante buffer detergenti e l'aggiunta di RNAsi per eliminare l'RNA dal DNA estratto. I passaggi successivi prevedono l'utilizzo di tamponi e resine che sono in grado di separare il DNA dalle altre macromolecole.

Il vantaggio di questo protocollo, oltre alla rapidità, è la possibilità di standardizzare sia la quantità che la qualità del DNA estratto. Esso presenta tuttavia anche degli svantaggi, come i costi elevati e la bassa resa di DNA genomico, quantificata attorno ai 2 µg in 100 µl.

7.2 Visualizzazione e quantificazione del DNA

Per verificare la corretta estrazione del DNA ed effettuare una valutazione qualitativa del genomico estratto si è proceduto ad un'analisi elettroforetica su gel di agarosio all'1%.

L'agarosio è un polisaccaride formato da unità di galattosio solubile a temperatura di ebollizione, ma che diventa solido man mano che si raffredda formando una matrice, la cui porosità dipende dalla concentrazione dell'agarosio. Questa tecnica permette la separazione del DNA su tale matrice in base alla carica e alla dimensione delle molecole di DNA analizzate: essendo il DNA carico negativamente per la presenza di gruppi fosfato, se posto in un campo elettrico migrerà verso il polo positivo. Per consentire la visualizzazione del DNA migrato il gel viene colorato con bromuro di etidio; questa molecola planare si intercala tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento emettendo luce fluorescente se irradiata con luce ultravioletta.

Il DNA genomico si visualizza come una singola banda di elevato peso molecolare; la sua intensità è proporzionale alla concentrazione. Il confronto con un marcatore di peso molecolare noto, permette la stima del DNA estratto per ciascun campione (Figura 7.1).

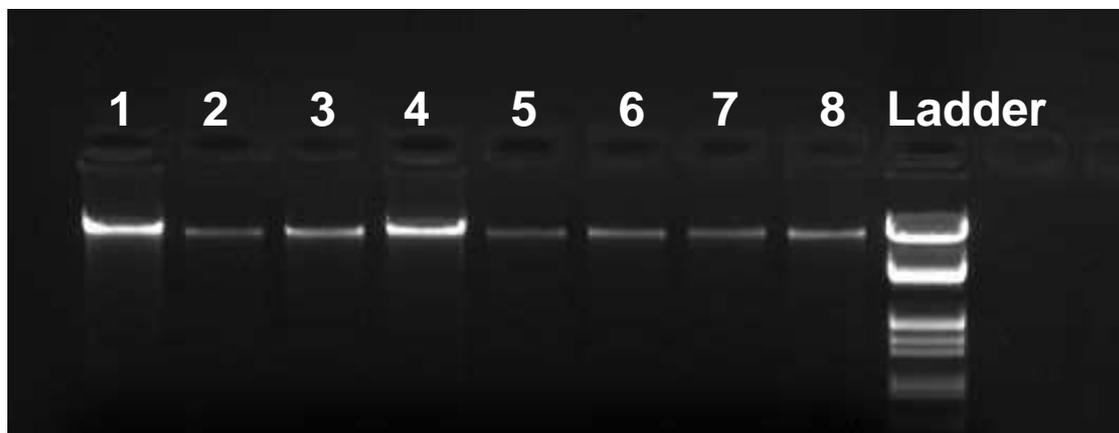


Figura 7.1 Analisi elettroforetica di 8 campioni di DNA estratti da alcune popolazioni.

7.3 Marcatori molecolari applicati

7.3.1 Marcatori microsatelliti (SSR)

In collaborazione con la Prof.ssa Silvia Fluch dell'Università di Innsbruck sono stati messi a punto alcuni marcatori microsatelliti. Inizialmente sono stati testati su alcuni campioni di prova i 10 microsatelliti sviluppati (Tabella 7.1).

SSR locus	Sequenza 5'-3'	Motivo ripetuto
RodA	F- CCTGTGCTACAGTTGG R- GCAGGTTACCAGTAAAAC	6AG
RodB	F- TATCTACAAGCCCAATG R- AGCACTCGAGTATGTTG	6CA
RodC	F- GATTGGAAGTGACAAGTC R- AGGGTGGTCTGAATG	6AG
RodD	F- ACTTAAAAGAATGCCTCTC R- CCCGTTTAGTATGGATG	6AG
RodE	F- TTCTTCTGATTTTCGTTGC R- TTTCTTAGGACCGATGATT	6AG
RodF	F- GATCACATGCTTATATGT R- CAGCATTTTAAACCA	6AG
RodG	F- GGACCGATGATTACTTCT R- GGACCGATGATTACTTCT	6AG
RodH	F- GACAAAATAGCTCCTCTAA R- GTTCTATTAATGGGGATT	6AG
RodI	F- GCACAAGGGAGGTATCAAG R- GTGGCTCCTGAGACATTTT	6AG
RodL	F- CTGTCAGCTTTTGGGTTAC R- CAGGTGGGTTCTCACA	6AG

Tabella 7.1 Elenco dei loci SSR sviluppati

Per i nostri campioni sono risultati riproducibili e significativi solamente 7 dei 10 loci sviluppati: RodA, RodC, RodD, RodE, RodG, RodH e RodI.

Amplificazione ed analisi dei microsatelliti

L'amplificazione dei loci SSR selezionati è stata ottenuta mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). Perché la reazione avvenga sono necessarie delle componenti specifiche:

- il DNA che si vuole amplificare, di cui si conoscono le sequenze terminali
- una coppia di primer a singolo filamento che identifichi la regione da amplificare
- i nucleotidi trifosfati (dNTPs)
- l'enzima Taq polimerasi
- un buffer di reazione che contiene i cofattori necessari a rendere ottimale l'amplificazione

Le tappe fondamentali della reazione di amplificazione sono:

- la denaturazione a 94°C del DNA che si separa in due filamenti
- l'annealing o appaiamento, in cui i primer complementari alle sequenze di interesse ibridizzano; questa fase avviene alla temperatura caratteristica di ogni coppia di primer
- l'estensione, in cui, grazie alla presenza dei nucleotidi, i primer si allungano ed avviene la sintesi di numerose copie del frammento di interesse

Queste tre fasi possono essere ripetute n volte, portando così all'amplificazione esponenziale della regione di interesse.

Nelle analisi di amplificazione del DNA sono stati utilizzati due protocolli differenti: l'amplificazione dei singoli loci oppure la tecnica della multiplex PCR. L'analisi multiplex prevede l'amplificazione contemporanea di più loci nella stessa reazione PCR. Da tenere in considerazione la temperatura di annealing in quanto vanno combinati i primer che amplificano alla stessa temperatura. Per poter eseguire le analisi in multiplex è stato necessario modificare le diverse combinazioni di primer affinché presentassero fluorofori di colori differenti in modo da non confondere i vari picchi durante la lettura del dato. Nel caso dei loci da noi considerati gli accoppiamenti sono stati: RodA e RodC (T di annealing 56°C), RodD, RodE, RodG e RodH (T di annealing 49°C). RodI è stato amplificato in singolo perché l'unico con una T di annealing di 65°C (Tabella 7.2).

Inizialmente tutti i campioni di *Rhododendron ferrugineum* sono stati amplificati in multiplex PCR così da rendere più rapide ed economiche le analisi. Nei casi in cui le amplificazioni multiplex non sono andate a buon fine i loci sono stati amplificati in singolo, mantenendo i primer marcati con gli

stessi fluorofori oppure marcandoli con il fluoroforo 6-FAM (blu) che è risultato essere quello con la migliore resa in caso di amplificazioni difficoltose.

SSR locus	T annealing (°C)	Fluoroforo	Dimensioni (bp)
RodA	56	6-FAM (F)	64-104
RodC	56	NED (R)	292-310
RodD	49	6-FAM (R)	127-194
RodE	49	NED (R)	110-145
RodG	49	VIC (F)	80-140
RodH	49	PET (F)	127-195
RodI	65	VIC (R)	207-234

Tabella 7.2 Caratteristiche locus SSR utilizzati nelle analisi. Tra parentesi è indicata la sequenza marcata: F= forward, R= reverse.

Il protocollo utilizzato per l'amplificazione dei loci microsatelliti considerati è:

- 1 µL di DNA
- 1 µL di primer forward 25 µM
- 1 µL di primer reverse 25 µM
- 1,5 µL di dNTPs
- 2,5 µL di buffer 10X
- 1,5 µL di MgCl₂
- 0,2 µL di Taq Gold® Applied Biosystems
- acqua milliQ fino ad arrivare ad un volume finale di 25 µL

Questo il caso della reazione con una sola coppia di primer. Nel caso di reazioni multiplex varia solamente la quantità di acqua mentre le quantità di buffer, dNTPs, magnesio ed enzima polimerasi

non cambiano. Quando, seguendo questo protocollo, non si è ottenuta una buona amplificazione né in multiplex né in singolo, è stato utilizzato un secondo protocollo di amplificazione che prevede l'utilizzo di un kit commerciale "puRe Taq Ready To Go PCR beads" (Amersham- Bioscience, Italia):

- 1 μ L di DNA
- 0,5 μ L di primer forward 25 μ M
- 0,5 μ L di primer reverse 25 μ M
- acqua milliQ per portare ad un volume finale di 10 μ L
- 2 beads ogni 5 campioni

Le beads liofilizzate contengono tutti i componenti fondamentali per la buona riuscita dell'amplificazione: dNTPs, buffer, magnesio e Taq polimerasi. Sono molto termostabili ed hanno una resa molto più alta della normale polimerasi. La reazione è stata fatta utilizzando due beads ogni cinque campioni per ridurre l'alto costo di questa seconda tecnica di amplificazione.

In tutti i casi comunque è stato utilizzato il seguente profilo di amplificazione:

- 3 min a 94°C (denaturazione iniziale)
 - 50 sec a 90°C
 - 50 sec alla T di annealing
 - 52 sec a 72°C
 - 30 min a 72°C (estensione finale)
- } 35 cicli

Effettuata l'amplificazione dei diversi loci SSR è stata stimata la dimensione degli alleli attraverso un sequenziatore di DNA, il modello ABI 3130 (Applied Biosystems). La tecnica si basa sulla separazione degli alleli in base alle dimensioni del frammento di DNA che li costituisce. Grazie ai fluorofori con cui sono stati marcati i diversi primers è possibile determinare la dimensione dei diversi alleli in paia di basi. Il protocollo per poter effettuare l'elettroforesi capillare prevede la preparazione di una soluzione composta da 1 μ L di DNA amplificato, 12 μ L di formammide (Applied Biosystems) e 0.2 μ L di size standard (SIZE STANDARD 500(-250)LIZ, Applied Biosystems). La formammide è indispensabile in quanto permette la denaturazione del DNA

precedentemente amplificato mentre il side standard è costituito da un pool di frammenti fluorescenti, di dimensioni note, che fornisce la scala di taratura utile nell'analisi successiva dei dati. Nel sequenziatore i campioni migrano in presenza di una forza elettroforetica secondo il loro peso molecolare; durante la migrazione i frammenti, grazie alla presenza di un sensore, vengono rilevati e ne vengono lette le dimensioni. I valori ottenuti che rappresentano le dimensioni dei frammenti sono stati stimati utilizzando il software GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Questo programma identifica i frammenti analizzando i "picchi" dell'elettroferogramma (Figura 7.2): in presenza di picchi con la stessa altezza e dimensione il campione è da considerarsi omozigote mentre in presenza di più picchi (due nel caso di diploidi) con dimensioni differenti si stabilisce che il campione sia eterozigote.

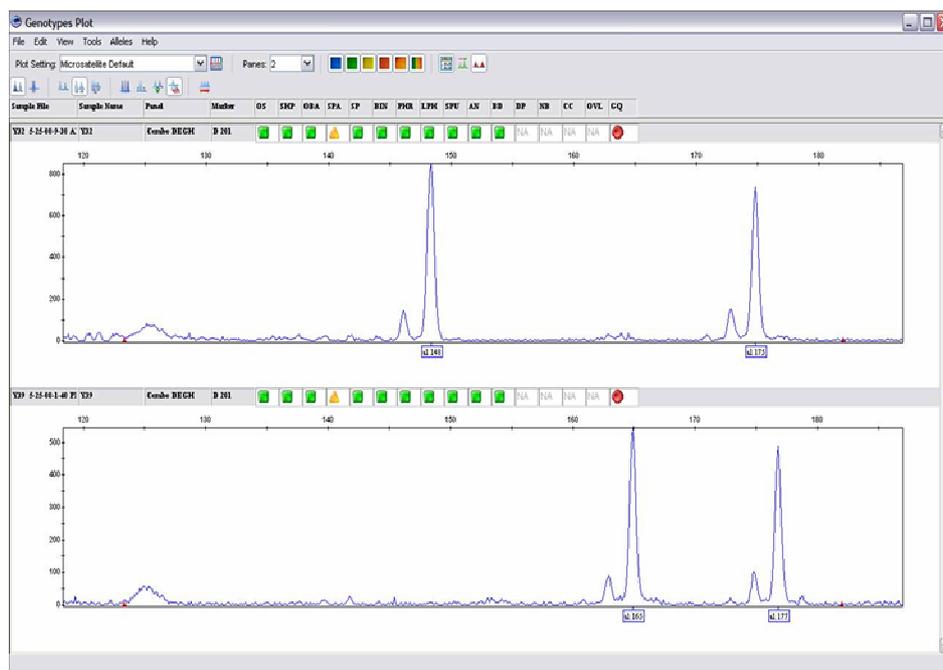


Figura 7.2 Esempio di elettroferogramma. In entrambi i casi sono identificati individui eterozigoti.

La capacità discriminante dei microsatelliti è appunto legata alle variazioni di dimensione degli alleli che sono espresse in paia di basi (bp). Bisogna però tener conto dell'errore sperimentale a cui questo metodo è soggetto: presenza nel DNA di composti che interferiscono con la PCR, errori della polimerasi (aggiunta di basi A), tipo e composizione in basi degli standard di riferimento utilizzati per la stima delle dimensioni degli alleli. Per cercare di ridurre questi errori i valori che vengono rilevati dal sequenziatore non sono considerati in assoluto ma vengono attribuiti a intervalli (bins) la cui larghezza varia in funzione del tipo di micro satellite (di-nucleotidico, tri-

nucleotidico). Creare i bins (binning) permette una lettura conservativa dei risultati che, da una parte comporta la perdita di informazioni in quanto gli alleli con differenza di 1 bp sono considerati uguali, ma dall'altra evita di considerare i falsi positivi ovvero alleli che in realtà sono legati ad un errore del metodo di analisi. La creazione del bin-set appropriato è stata fatta considerando tutti gli individui delle tre specie oggetto di studio.

Analisi dei dati

I dati relativi ai marcatori microsatelliti ottenuti dall'analisi di tutte le popolazioni di *Rhododendron ferrugineum* e *Rhododendron x intermedium* sono stati sottoposti ad analisi statistiche per la stima dei parametri di genetica di popolazioni.

I profili SSR come descritto in precedenza, sono stati dedotti direttamente dall'analisi degli elettroferogrammi attraverso il software GENEMAPPER (Applied Biosystems).

Gli individui e le relative informazioni genetiche e geografiche sono stati organizzati in un dataset e tramite l'applicazione GenALEx v. 6 per Microsoft Excel (Peakall e Smouse, 2006) sono stati preparati i file di input per alcuni dei principali software di elaborazione dati.

Per ogni popolazione e locus SSR, con il programma FSTAT (Goudet, 2001) sono stati calcolati i principali parametri genetici: il numero di alleli medio osservato (N_a), la percentuale di loci polimorfici (P%), l'eterozigosità osservata (H_o), l'eterozigosità attesa (H_e) e il numero di alleli privati (PA). La diversità genetica intra-popolazione è stata calcolata in termini di ricchezza allelica (A) (El Mousadick e Petit, 1996) e la distanza genica (GD).

Il programma FSTAT è stato utilizzato anche per saggiare se le popolazioni naturali siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. La significatività delle deviazioni dall'equilibrio è stata analizzata per ogni locus per ogni popolazione utilizzando un "exact test" basato sul metodo delle catene di Markov (Guo e Thompson, 1992) con i seguenti parametri: 10000 permutations, 2000 dememorisation steps e 500 batches. La soglia di significatività è stata fissata a $p=0.05$. Una popolazione si discosta in modo significativo dall'equilibrio di Hardy-Weinberg quando il corrispondente valore di p è uguale o minore alla soglia fissata. Data la presenza di test multipli è stata applicata la correzione di Bonferroni abbassando la soglia di significatività a $p=0.0001$.

Per analizzare l'indipendenza dei loci microsatellite FSTAT è stato utilizzato per calcolare il linkage disequilibrium per tutte le coppie di loci.

Per i loci polimorfici è stato calcolato l'indice di fissazione (F_{IS}) per verificare la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e per stimare la diversità genetica tra le popolazioni (Weir e Cockerham, 1984). L'indice F_{IS} varia da -1 a +1; valori negativi indicano eccessi di eterozigoti (outbreeding) mentre valori positivi indicano eccessi di omozigoti (inbreeding).

Per verificare l'importanza del livello di eterozigosi sono stati valutati anche gli alleli nulli, utilizzando il programma MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout, 2004) con un intervallo di confidenza di 99% e numero di randomizzazioni di 1000.

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA), calcolata con il programma ARLEQUIN (Excoffier, 2005) è stata utilizzata per valutare la struttura genetica dell'intero campionamento. La proporzione della variazione genetica totale, ripartita in tre gruppi in base alle differenze (1) tra gruppi di popolazioni (2) tra popolazioni all'interno di gruppi (3) tra individui all'interno delle popolazioni, è stata stimata mediante la statistica di Wright (1951). La significatività dell'indice di fissazione relativo ai tre livelli di analisi (tra gruppi = F_{CT} , tra popolazioni F_{SC} e all'interno della popolazione F_{ST}) è stata verificata mediante un test non parametrico descritto da Excoffier et al. (1992). In questo lavoro i gruppi sono stati creati in base alle aree geografiche: Appennini, Alpi Marittime, Alpi centro-orientali e Pirenei.

Tramite l'utilizzo del software POPGENE 3.2 (Yeh et al., 1997) la distanza genetica tra i singoli individui e tra i diversi gruppi di individui (popolazioni) è stata calcolata come distanza di Nei, valutata sulla base delle frequenze dei singoli alleli (Nei, 1983). Queste distanze sono state visualizzate graficamente mediante un dendrogramma con il metodo UPGMA (Unweighted Pair-Grop Method).

Il programma STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al., 2000) è stato utilizzato per dedurre la struttura di popolazione dai dati genetici. Il software è in grado di identificare la presenza di una strutturazione genetica all'interno di un insieme di dati senza utilizzare l'informazione della suddivisione "a priori" in popolazioni. L'approccio, in questo caso, è diverso dai metodi descritti precedentemente, dove le analisi vengono effettuate su gruppi di individui preformati, nel caso di questo lavoro popolazioni geografiche. STRUCTURE assume un modello con un determinato numero di popolazioni (K), quindi assegna i genotipi relativi ad ogni individuo alle K differenti popolazioni in modo tale che non ci sia linkage disequilibrium fra coppie di loci e tutte le popolazioni siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Dopo varie corse con differenti valori di K è stato possibile calcolare

$Pr(D/K)$, la probabilità dei dati ottenuti dato un determinato K ; viene quindi scelto il K più probabile. In questo lavoro, l'analisi è stata condotta utilizzando il modello "admixture", implementato nel programma STRUCTURE, tramite una procedura di calcolo di tipo bayesiano con 100.000 iterazioni. Il risultato ottenuto è una stima del numero di popolazioni che meglio si adatta all'insieme dei dati, da comparare con le popolazioni reali.

Per saggiare la correlazione fra distanza genetica e distanza geografica è stato effettuato un test di Mantel (1967) con 999 permutazioni casuali, confrontando $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ e il logaritmo naturale delle distanze geografiche.

Al fine di valutare le relazioni genetiche tra gli individui delle tre popolazioni appenniniche, è stata effettuata un'analisi delle componenti principali (PCA).

7.3.2 Marcatori filogenetici

Tutti gli individui campionati nelle aree ibride (AL11, AL12 e AL13) sono stati analizzati mediante un approccio integrato che, oltre al riconoscimento dei caratteri morfologici tipici di ognuna delle tre specie oggetto di studio, ha previsto anche un'analisi filogenetica mediante l'utilizzo di marcatori molecolari.

I marcatori molecolari filogenetici che sono stati utilizzati sono stati:

- due marcatori nucleari (ITS e At103) (Tabella 7.3)
- due marcatori plastidiali (psbA-trnH e matK) (Tabella 7.3)

Primer	Sequenza (5'-3')	Dimensioni (bp)	T di annealing
Nucleari			
ITS (Nnc18s10)	AGGAGAAGTCGTAACAAG	600-700	53°C
ITS (C26A)	GTTTCTTTTCCTCCGCTT		
At103F	CTTCAAGCCMAAGTTCATCTTCTA	300-400	55°C
At103R	TTGGCAATCATTGAGGTACATNGTMACATA		
Plastidiali			
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	500-600	53°C
trnH	CGCGCATGGTGGATTCACAAATC		
matK (390)	CGATCTATTCATTCAATATTC	800-900	53°C
matK (1326)	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT		

Tabella 7.3 Marcatori molecolari filogenetici: sequenze, dimensioni e temperature di annealing.

Amplificazione e analisi delle sequenze

Per ciascuna coppia di primer (Tabella 7.4), la reazione di PCR è stata così allestita:

- 1 µL di DNA diluito 1:10
- 1 puReTaq Ready-To-Go PCR bead (Amersham Bioscience, Italia)
- 1 µL primer forward 10 µM
- 1 µL primer reverse 10 µM
- acqua milliQ per portare ad un volume finale di 25 µL

I cicli di PCR consistono in una denaturazione iniziale a 94°C per 7 minuti, 35 cicli di denaturazione (45 secondi a 94°C), annealing (30 secondi alle diverse temperature di annealing secondo la Tabella 3.6) ed estensione (1 minuto a 72°C), e un'estensione finale a 72°C per 7 minuti. I prodotti ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio 1,5% TAE 10X con un marcatore di peso molecolare per valutare lunghezza e concentrazione.

I frammenti amplificati sono stati successivamente purificati mediante il PCR DNA Purification Kit (Qiagen, Italia). I prodotti purificati sono stati sottomessi all'azienda MacroGen (<http://www.macrogen.com>) per la fase di sequenziamento.

Analisi dei dati

Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute vista la loro lunghezza (~ 600 basi) sono state letti separatamente dal lato forward e da quello reverse e confrontati al fine di ottenere una sequenza consenso. Le sequenze ottenute sono state analizzate con il programma BioEdit ver. 6.0.7 (Hall, 1999) Le sequenze sono così state allineate grazie al software ClustalW (Thompson et al., 1994).

Risultati

Capitolo 8

Risultati

8.1 Obiettivo I: caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di *Rhododendron ferrugineum*

8.1.1 Confronto tra le popolazioni Appenniniche e Alpine

Inizialmente sono state prese in esame le 3 popolazioni di *Rhododendron ferrugineum* campionate sull'Appennino tosco-emiliano in quanto le più significative perché rappresentanti un caso di pseudo-rarità.

Queste 3 popolazioni (AP1, AP2 e AP3) sono state confrontate con 3 popolazioni delle Alpi Marittime (AM1, AM2 e AM3) e 6 popolazioni delle Alpi centro-orientali (AL1, AL3, AL4, AL5, AL8 e AL9) attraverso l'uso di 7 loci microsatelliti (RodA, RodC, RodD, RodE, RodG, RodH e RodI).

Tutti i loci SSR sono risultati polimorfici (Tabella 8.1) rivelando un totale di 82 alleli in 181 individui appartenenti alle 12 popolazioni analizzate. Il numero di alleli per locus varia da 7 (locus RodC) a 20 (locus RodD), con una media di 11.7 differenti alleli per locus. Per ogni locus è stata calcolata la diversità genetica, in termini di eterozigotità attesa (He). La media mostra un intervallo ristretto, con valori compresi tra 0.60 (locus RodG) e 0.84 (locus RodD).

Nei campioni analizzati sono stati evidenziati 23 alleli privati, il 28% del totale (Tabella 8.2).

Loci SSR	Dimensioni (bp)	Na	Ho	He	Fis
RodA	64-84	8	0.61	0.72	-0.18
RodC	291-310	7	0.22	0.73	0.33
RodD	127-181	20	0.30	0.84	0.46
RodE	82-145	10	0.21	0.71	0.44
RodG	102-140	11	0.28	0.60	0.30
RodH	165-188	15	0.47	0.67	0.19
RodI	207-234	11	0.42	0.82	0.26

Tabella 8.1 I loci SSR utilizzati per l'analisi di 12 popolazioni di *Rhododendron ferrugineum*. Na: numero di alleli per ogni locus, Ho: eterozigotità osservata, He: eterozigotità attesa, Fis: indice di fissazione.

Popolazione	Locus	Allele	Frequenza
AP1	RodC	298	0.38
AP2	RodE	145	0.22
AP2	RodG	138	0.17
AP3	RodD	166	0.03
AP3	RodI	234	0.06
AM1	RodD	154	0.05
AM1	RodD	164	0.35
AM1	RodD	177	0.05
AM1	RodH	171	0.15
AM2	RodD	171	0.09
AM2	RodD	181	0.09
AM2	RodE	124	0.09
AM2	RodH	167	0.05
AM2	RodH	189	0.09
AM3	RodD	148	0.25
AM3	RodD	175	0.17
AM3	RodE	116	0.04
AL1	RodE	118	0.28
AL3	RodH	165	0.04
AL5	RodD	133	0.03
AL9	RodG	80	0.03
AL9	RodH	191	0.03
AL9	RodH	195	0.03

Tabella 8.2 Frequenza e localizzazione degli Alleli privati presenti in ogni popolazione analizzata.

Sigla	Nr. di individui	Na	A _[18]	P(%)	Ho	He	Fis	PA	GD
AP1	21(16)	2.71	2.46	71.43	0.21	0.36	0.46	1	0.38
AP2	10(9)	3.14	3.14	85.71	0.13	0.41	0.72	2	0.46
AP3	19(18)	2.71	2.31	100.00	0.23	0.31	0.29	2	0.32
AM1	10	4.86	4.71	85.71	0.47	0.58	0.23	4	0.61
AM2	11	5.57	5.33	100.00	0.35	0.65	0.49	5	0.69
AM3	12	4.86	4.51	100.00	0.41	0.64	0.40	3	0.68
AL1	16	3.43	3.17	100.00	0.48	0.50	0.07	1	0.52
AL3	14	4.14	3.67	100.00	0.45	0.50	0.14	1	0.52
AL4	10	3.14	3.07	85.71	0.47	0.45	-0.007	0	0.47
AL5	20	3.86	3.21	100.00	0.38	0.45	0.18	1	0.46
AL8	20	4.00	3.10	100.00	0.39	0.47	0.19	0	0.49
AL9	19	4.00	3.05	100.00	0.37	0.47	0.24	3	0.49
Media	15.17(14.58)	3.87	3.48	94.05	0.36	0.48	0.28	1.92	0.51

Tabella 8.3 Numero di campioni (tra parentesi il numero di campioni privi di individui clonali), Na numero di alleli, ricchezza allelica (A, sulla base del minimo di individui diploidi, 9), percentuale di polimorfismo (P%), eterozigosità osservata (Ho) e attesa (He), indice di fissazione (Fis), numero di alleli privati (PA) e distanza genica (GD) delle 12 popolazioni analizzate.

Prima del calcolo dei parametri genetici, siccome *Rhododendron ferrugineum* si può riprodurre

attraverso via vegetativa (Escaravage et al., 1998) è stata testata la presenza di individui clonali nelle popolazioni analizzate. Solamente le tre popolazioni appenniniche hanno evidenziato la presenza di cloni; la popolazione AP1 mostra 4 gruppi di individui clonali (3 composti da 2 individui e 1 composto da 3 individui per un totale di 9 campioni clonali) mentre le popolazioni AP2 e AP3 mostrano 2 coppie di individui clonali. Per ogni gruppo di cloni è stato considerato solamente un individuo per il calcolo dei coefficienti di inbreeding al fine di non alterare i risultati.

I valori dei parametri di diversità genetica intra-popolazione come la ricchezza allelica ($A_{[16]}$), l'eterozigosità osservata (H_o) e attesa (H_e), il coefficiente di inbreeding (F_{is}) e la diversità genetica (GD) delle dodici popolazioni analizzate, sono indicati nella Tabella 8.3.

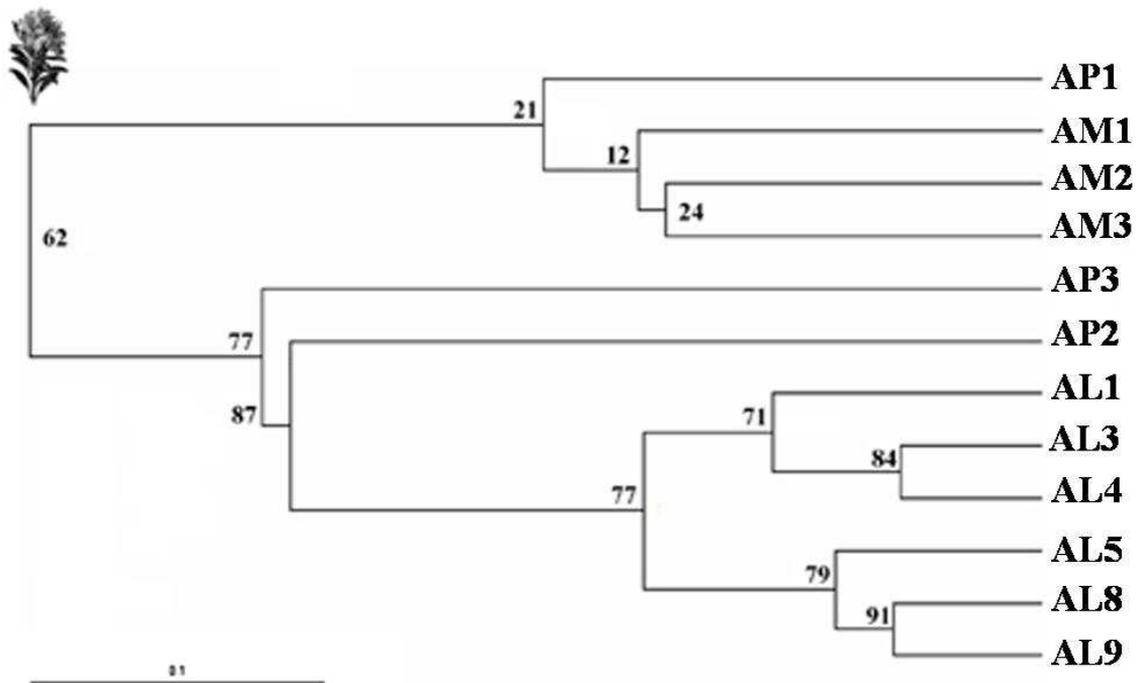
Le popolazioni AP1 e AP3 mostrano i più bassi valori di ricchezza allelica (2.46 e 2.31 rispettivamente) mentre le tre popolazioni delle Alpi Marittime (AM1, AM2 e AM3) mostrano i valori più alti (4.71, 5.33, 4.51 rispettivamente).

I valori medi dell'eterozigosità osservata ed attesa nei campioni analizzati risultano essere 0.36 e 0.48 rispettivamente. Il deficit di eterozigosità è stata riscontrata in tutte le popolazioni analizzate; AP1, AP2 e AP3 mostrano i valori più bassi di H_o (0.21, 0.13 e 0.23 rispettivamente). In accordo con il deficit di eterozigosità riscontrata, i valori più alti del coefficiente di inbreeding (F_{is}) si trovano in AP1 (0.46) e AP2 (0.72). questo eccesso di omozigoti nelle popolazioni appenniniche potrebbe derivare dalla presenza di alleli nulli in alcuni loci. Il software MICRO-CHECKER, infatti, ha individuato possibili alleli nulli per gli alleli del locus RodD (popolazioni AP1 e AP2), del locus RodG (tutte e tre le popolazioni appenniniche) e del locus RodH (solo la popolazione AP1). Le frequenze di questi alleli nulli non risultano, però, particolarmente significative e l'alto valore dell'indice F_{is} potrebbe essere dovuto a reali condizioni di omozigosità.

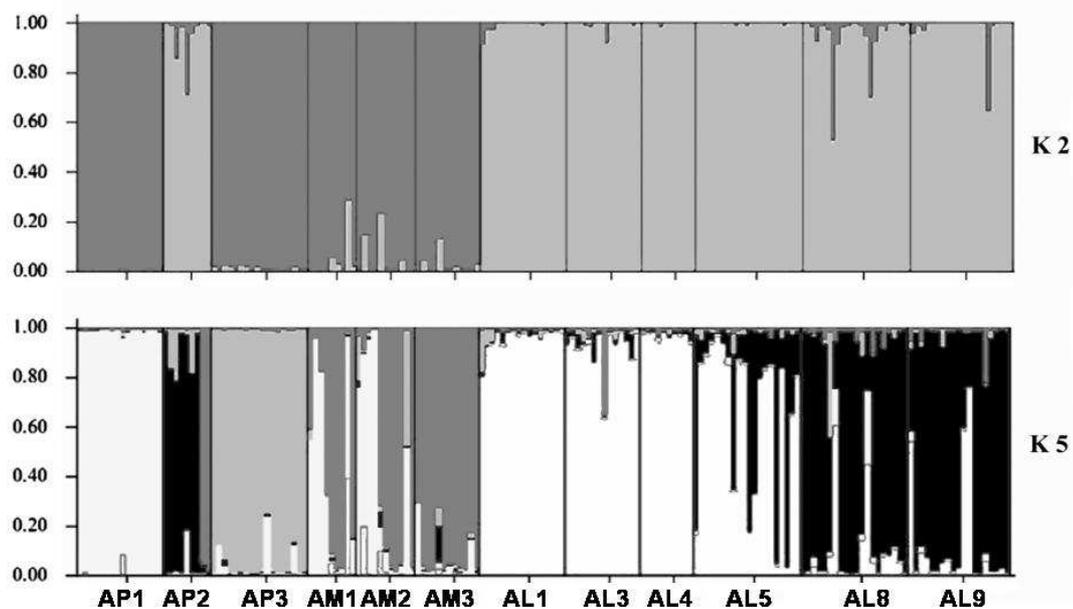
Sono quindi state prese in considerazione le relazioni tra le popolazioni Appenniniche e le altre nove popolazioni campionate sulle Alpi Marittime e sulle Alpi centro-orientali.

Inizialmente è stata eseguita una cluster analysis (Figura 8.1 A) basata sulla distanza genetica di Nei (Nei et al., 1983). In accordo con la loro distribuzione geografica, le popolazioni delle Alpi centro-orientali e delle Alpi Marittime clusterizzano in due gruppi distinti, mentre le tre popolazioni Appenniniche risultano associate ad entrambi i due gruppi principali. La popolazione AP1 è graficamente vicina alle popolazioni delle Alpi Marittime, mentre le altre due popolazioni appenniniche, AP2 e AP3, mostrano una chiara separazione genetica dalle popolazioni alpine.

Per meglio investigare le relazioni tra le popolazioni campionate, è stato utilizzato anche un approccio a livello di individuo. Sono stati analizzati i genotipi SSR mediante il software STRUCTURE tramite 10.000 interazioni MCMC (Markov chain Monte Carlo) dopo un periodo di burn-in di 10.000 interazioni, senza informazioni precedenti sull'origine degli individui assegnati alle varie popolazioni. Il valore ottimale di K è stato stimato mediante il calcolo del $\Delta \ln$, per identificare il livello massimo nella struttura gerarchica (Evanno et al., 2005). Per questo studio i valori di K ottimali sono risultati essere K=2 e K=5 (Figura 4.2). la structure analysis con K=2 (Figura 8.1 B in alto) mostra risultati simili al dendrogramma basato sulle distanze di Nei, mentre con K=5 si mette in evidenza una separazione tra due popolazioni Appenniniche. Gli individui delle popolazioni AP1 e AP3 vengono collocati in due gruppi separati ($Q[AP1]=0.98$, $Q[AP3]=0.94$). gli individui della popolazione AP2 si raggruppano mediamente ($Q[AP2]=0.69$) insieme alle popolazioni AL8 e AL9 e ad alcuni individui della popolazione AL5 (Figura 8.1 B in basso).



A



B

Figura 8.1 A: Dendrogramma (UPGMA) sulla base della distanza genetica di Nei, delle 12 popolazioni di *R. ferrugineum* analizzate con 7 loci SSR. B: Structure analysis delle 12 popolazioni.

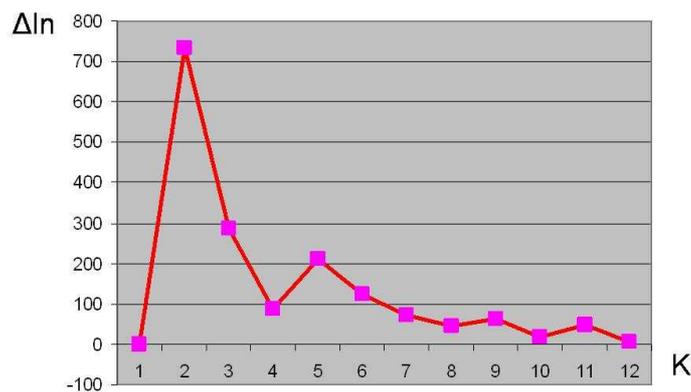


Figura 8.2 Grafico rappresentante la relazione tra K e $\Delta\ln$ per la scelta di K nella structure analysis delle 12 popolazioni analizzate.

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA) è stata utilizzata per verificare l'esistenza di una struttura genetica all'interno dell'insieme dei dati presi in esame (Tabella 8.4). L'analisi gerarchica ha mostrato che la maggior parte della variazione genetica (60.48%) è dovuta alla variazione all'interno delle popolazioni. Non irrilevanti risultano anche le variazioni genetiche "fra popolazioni all'interno dei gruppi" (20.73%) e "fra gruppi" (18.78%). Questi dati suggeriscono una significativa differenziazione di *Rhododendron ferrugineum* sia a livello di popolazione che di regione. I gruppi (regioni) sono stati scelti sulla base della distribuzione geografica delle popolazioni analizzate: Appennini, Alpi Marittime e Alpi centro-orientali.

	Gradi di libertà	Variazione totale (%)	Indici di fissazione	P-value
Fra gruppi	2	18.78	$F_{CT} = 0.19$	<0.001
Fra popolazioni all'interno di gruppi	9	20.73	$F_{SC} = 0.26$	<0.001
All'interno delle popolazioni	336	60.48	$F_{ST} = 0.40$	<0.001

Tabella 8.4 Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA per 181 individui raggruppati in 12 popolazioni provenienti da tre regioni geografiche diverse. I risultati provengono da 1023 permutazioni.

Le relazioni tra le tre popolazioni appenniniche sono analizzate mediante l'analisi delle componenti principali (PCA). L'ordinamento dei dati sulla base delle prime due componenti principali (Figura 8.4) mostra una chiara separazione tra le tre popolazioni appenniniche

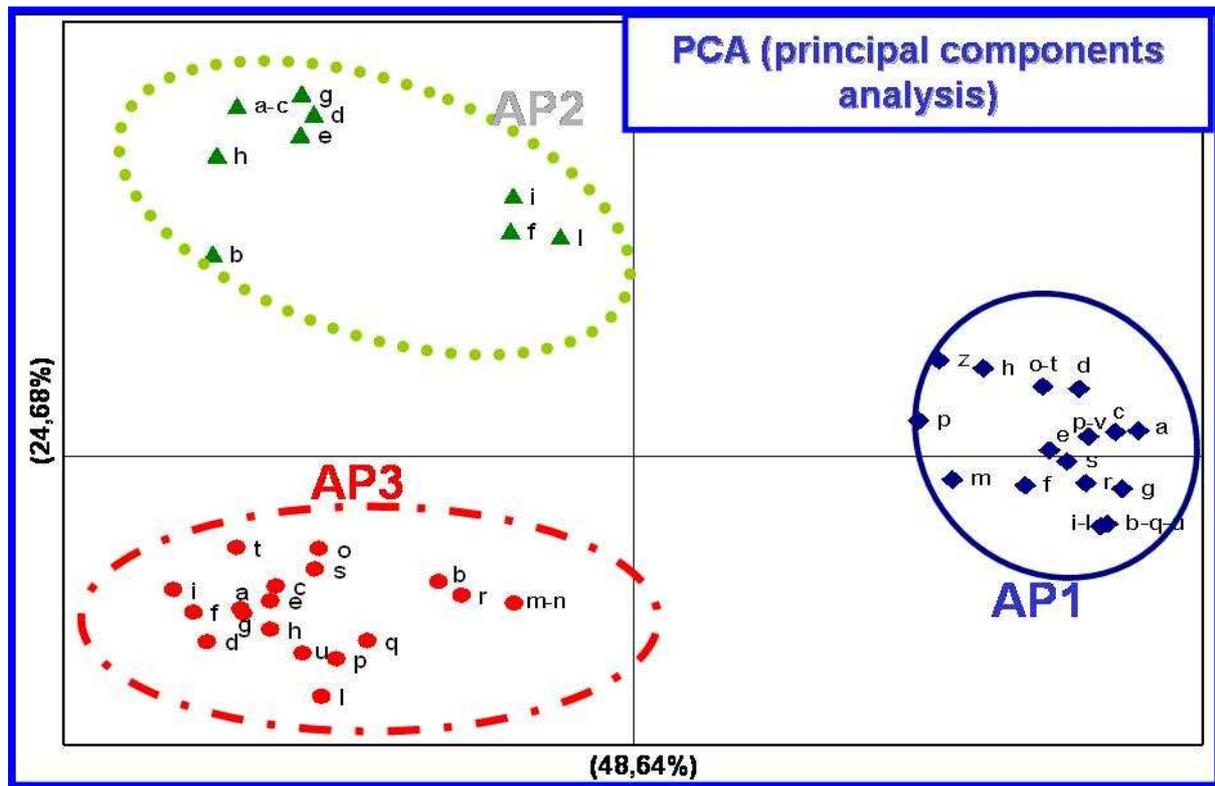


Figura 8.4 Ordinamento dei campioni delle tre popolazioni appenniniche secondo le prime due componenti principali.

Questi risultati concordano con gli alti valori della F_{ST} calcolati tra le tre popolazioni (AP1-AP2=0.56, AP1-AP3=0.58 e AP2-AP3=0.50). Nella Tabella 4.5 sono indicati tutti i valori di F_{ST} per ogni coppia di popolazioni analizzate.

	AP1	AP2	AP3	AM1	AM2	AM3	AL1	AL3	AL4	AL5	AL8	AL9
AP1	0.0000											
AP2	0.5627	0.0000										
AP3	0.5840	0.5031	0.0000									
AM1	0.2445	0.4356	0.4397	0.0000								
AM2	0.1736	0.3526	0.3708	0.0494	0.0000							
AM3	0.2681	0.3640	0.3674	0.0663	0.0462	0.0000						
AL1	0.5178	0.4374	0.4774	0.3688	0.3353	0.3253	0.0000					
AL3	0.5252	0.3712	0.4618	0.3703	0.3180	0.3135	0.1393	0.0000				
AL4	0.5568	0.4186	0.5177	0.3872	0.3429	0.3303	0.0993	0.0143	0.0000			
AL5	0.5500	0.3949	0.4693	0.4029	0.3775	0.3604	0.1646	0.1351	0.0935	0.0000		
AL8	0.4767	0.2607	0.4672	0.3558	0.3235	0.3069	0.2595	0.2156	0.2039	0.1682	0.0000	
AL9	0.5008	0.2985	0.4571	0.3826	0.3293	0.3263	0.1771	0.1916	0.1702	0.1353	0.0609	0.0000

Tabella 8.5 Valori di F_{ST} . In neretto le relazioni tra le tre popolazioni appenniniche

Il Mantel test (Figura 8.5) rivela una significativa correlazione tra la matrice delle distanze genetiche e la matrice delle distanze geografiche ($r = 0.315$, $P = 0.001$, 999 permutazioni) indicando il ruolo dell'isolamento geografico nel plasmare la struttura genetica delle attuali popolazioni appenniniche.

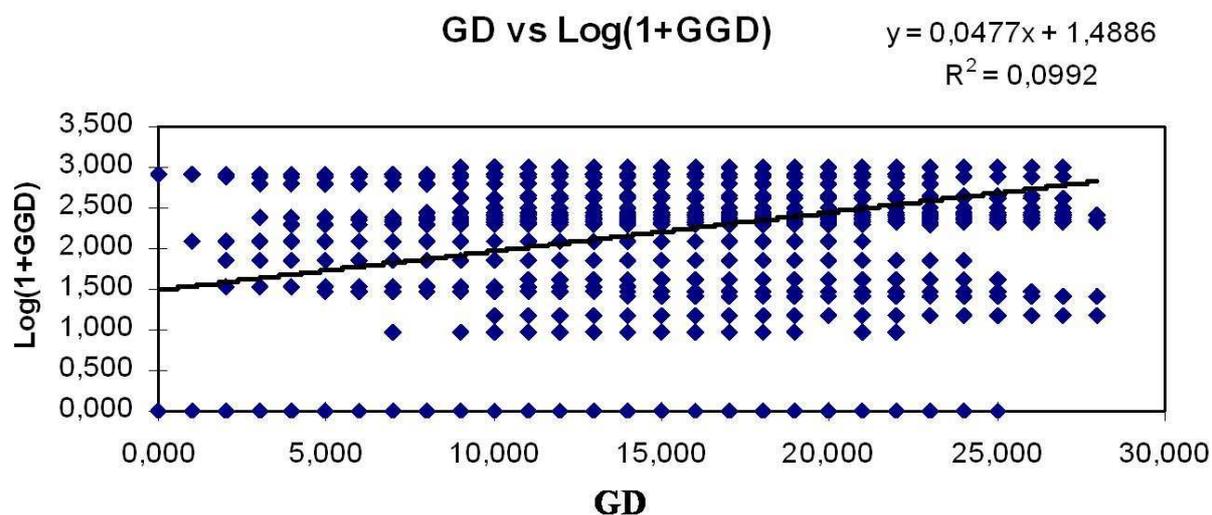


Figura 8.5 Risultati del Test di Mantel.

8.1.2 Variabilità genetica di *Rhododendron ferrugineum* nell'intero areale

L'analisi di *Rhododendron ferrugineum* è stata poi estesa a tutte le popolazioni campionate nell'areale (Tabella 6.1). Sono state processate un totale di 27 popolazioni (395 individui) attraverso l'uso di 6 loci microsatelliti (RodA, RodC, RodD, RodE, RodH e RodI). A differenza dell'analisi precedente (paragrafo 8.1.1), il locus RodG non è stato preso in considerazione in quanto non è risultato di efficiente resa nell'amplificazione per le 6 popolazioni dell'area pirenaica.

Anche in questo caso tutti e 6 i loci presi in esame sono risultati polimorfici (Tabella 8.6) rivelando un totale di 82 alleli in 395 individui appartenenti alle 27 popolazioni analizzate.

Loci SSR	Dimensioni (bp)	Na	Ho	He	Fis
RodA	64-84	10	0.68	0.73	-0.27
RodC	291-310	7	0.16	0.58	0.42
RodD	127-181	24	0.32	0.84	0.42
RodE	82-145	11	0.25	0.63	0.30
RodH	165-188	15	0.39	0.62	0.19
RodI	207-234	13	0.53	0.84	0.15

Tabella 8.6 Dettagli dei loci SSR utilizzati per l'analisi delle 27 popolazioni di *Rhododendron ferrugineum*. Na: numero di alleli per ogni locus, Ho: eterozigosità osservata, He: eterozigosità attesa, Fis: indice di fissazione.

Il numero di alleli per locus varia da 7 (locus RodC) a 24 (locus RodD) con una media di 13.3 differenti alleli per locus.

Per ogni locus è stata calcolata la diversità genetica, in termini di eterozigotità attesa (H_e) che va da un minimo di 0.58 (RodC) a un massimo di 0.84 (RodD).

Sono inoltre stati evidenziati 20 alleli privati, il 25% del totale degli alleli (Tabella 8.7).

Popolazione	Locus	Allele	Frequenza
AP2	RodE	145	0.20
AP3	RodI	234	0.05
AM1	RodD	154	0.05
AM1	RodH	171	0.15
AM3	RodD	171	0.09
AM3	RodD	181	0.09
AM3	RodE	124	0.09
AM3	RodH	167	0.04
AM3	RodH	189	0.09
AM6	RodE	141	0.10
PY1	RodA	68	0.10
PY1	RodD	156	0.15
PY4	RodD	179	0.05
AL3	RodH	165	0.04
AL9	RodH	191	0.03
AL9	RodH	195	0.03
AL10	RodD	152	0.09
AL12	RodD	146	0.26
AL12	RodI	209	0.13
AL12	RodI	217	0.02

Tabella 8.7 Frequenza e localizzazione degli Alleli privati presenti in ogni popolazione analizzata.

Come per l'analisi precedente, anche in questo caso è stata testata la presenza di individui clonali. Gli individui clonali sono così distribuiti nelle popolazioni esaminate:

Popolazioni dell'Appennino settentrionale (AP1: 3 gruppi da 2 individui clonali e 1 gruppo di 3 individui clonali; AP2 1 gruppo da 3 individui clonali; AP3: 5 gruppi da 2 individui clonali).

Popolazioni delle Alpi Marittime (AM6 :1 gruppo di 2 individui clonali,)

Popolazioni dei Pirenei (PY4 : 1 gruppo di 2 individui clonali; PY5 :1 gruppo di 2 individui clonali; PY6: 1 gruppo di 2 individui clonali),

Popolazioni delle Alpi centro-orientali (AL2 :1 gruppo di 2 individui clonali, AL2 :1 gruppo di 2 individui clonali (AL10: 1 gruppo di 3 individui clonali; AL11 :2 gruppo di 2 individui clonali.

Di ogni gruppo (AP, AM, PY, AL) è stato considerato un individuo nel calcolo dei parametri successivi per non alterare i risultati.

I valori dei parametri di diversità genetica intra-popolazione delle 27 popolazioni analizzate sono indicati nella Tabella 8.8.

Sigla	Nr. di individui	Na	A _[16]	P%	Ho	He	F _{IS}	PA	GD
AP1	21(16)	2.33	2.17	66.67	0.20	0.33	0.41	0	0.34
AP2	10(8)	2.83	2.83	83.33	0.13	0.40	0.72	1	0.45
AP3	19(14)	2.83	2.39	100.00	0.21	0.30	0.27	1	0.31
AM1	10	5.17	4.83	83.33	0.50	0.62	0.24	2	0.65
AM2	12	5.17	4.61	100.00	0.42	0.65	0.39	0	0.69
AM3	11	5.67	5.20	100.00	0.33	0.65	0.52	5	0.70
AM4	10	2.83	2.81	83.33	0.43	0.42	0.03	0	0.45
AM5	10	3.33	3.29	83.33	0.50	0.52	0.09	0	0.55
AM6	10(9)	3.00	3.00	83.33	0.35	0.47	0.31	1	0.51
PY1	20	4.00	3.48	100.00	0.33	0.51	0.39	2	0.53
PY2	12	3.33	2.97	83.33	0.49	0.45	-0.04	0	0.47
PY3	10	2.83	2.76	83.33	0.45	0.42	-0.01	0	0.45
PY4	10(9)	2.83	2.78	66.67	0.41	0.40	0.03	1	0.42
PY5	12(11)	2.33	2.28	83.33	0.41	0.40	0.03	0	0.42
PY6	10(9)	2.67	2.57	66.67	0.20	0.32	0.41	0	0.34
AL1	16	3.50	3.15	100.00	0.51	0.52	0.05	0	0.54
AL2	23(22)	3.33	2.65	83.33	0.42	0.41	0.02	0	0.42
AL3	14	4.17	3.50	100.00	0.43	0.49	0.16	1	0.51
AL4	10	3.33	3.32	83.33	0.42	0.37	0.20	0	0.52
AL5	20	4.00	3.73	100.00	0.45	0.53	0.17	0	0.54
AL6	20	3.00	2.89	100.00	0.43	0.50	0.16	0	0.51
AL7	21	3.50	3.03	100.00	0.36	0.53	0.35	0	0.55
AL8	20	4.17	3.11	100.00	0.42	0.57	0.29	0	0.59
AL9	20	4.00	3.14	100.00	0.43	0.55	0.25	2	0.57
AL10	11(9)	2.83	3.07	83.33	0.39	0.51	0.29	1	0.55
AL11	10	2.83	2.91	83.33	0.43	0.41	-0.01	0	0.43
AL12	23(21)	4.67	4.44	100.00	0.43	0.66	0.37	3	0.68
Media	14.63	3.50	3.22	88.89	0.40	0.48	0.21	0.74	0.51

Tabella 8.8 Parametri di diversità genetica considerati e loro valori. A_[16], ricchezza allelica Ho: eterozigotità osservata, He: eterozigotità attesa; F_{IS}: coefficiente di inbreeding e GD: diversità genetica.

Le tre popolazioni appenniniche (AP1, AP2 e AP3) e cinque delle sei popolazioni pirenaiche (PY2, PY3, PY4, PY5 e PY6) mostrano i valori di ricchezza allelica (2.17, 2.83, 2.39, 2.97, 2.76, 2.78, 2.28 e 2.57 rispettivamente) tra i più bassi mentre i più alti sono quelli di tre popolazioni delle Alpi Marittime (AM1: 4.83, AM2: 4.61 e AM3: 5.20).

I valori medi dell'eterozigosità osservata ed attesa nei campioni analizzati risultano essere 0.40 e 0.48 rispettivamente. Il deficit di eterozigosità è stato riscontrato in quasi tutte le popolazioni analizzate (escluse PY2, PY3 e AL11 in cui si riscontra al contrario un eccesso di eterozigoti), evidenziando quindi alti valori di inbreeding soprattutto nelle popolazioni AP1, AP2, AM2, AM3, PY1 e PY6. Anche in questo caso sono state prese in esame le relazioni tra tutte le popolazioni mediante una cluster analysis, basata sulla distanza genetica di Nei (1983) (Figura 8.6).

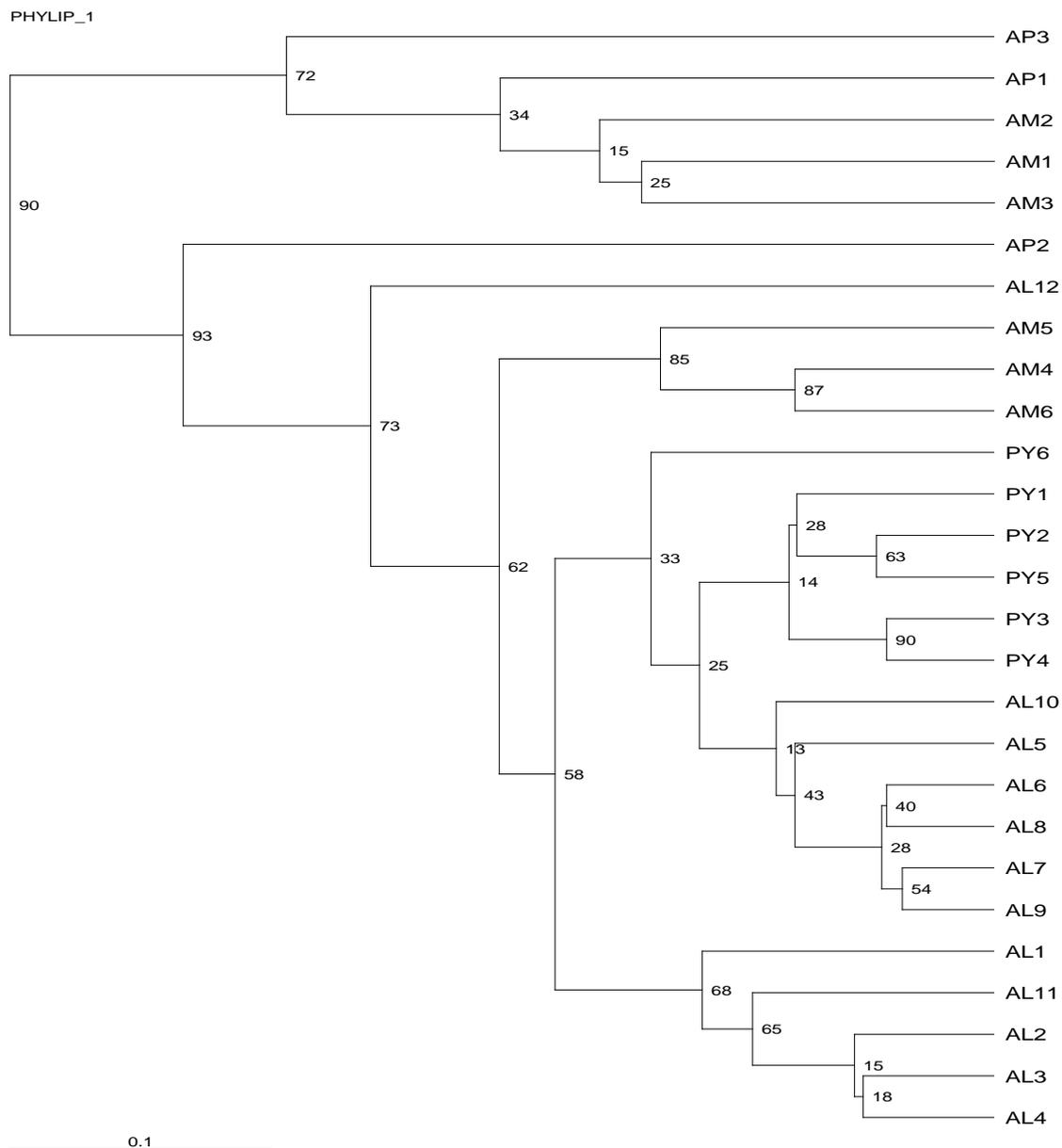


Figura 8.6 Dendrogramma (UPGMA) sulla base della distanza genetica di Nei, delle 27 popolazioni di *R. ferrugineum* analizzate con 6 loci SSR.

La cluster analysis evidenzia come le popolazioni analizzate si raggruppano principalmente sulla base della loro distribuzione in quattro aree geografiche. Occorre però sottolineare alcuni risultati:

- le popolazioni appenniniche AP1 e AP3 sono geneticamente poco distanti da tre popolazioni delle Alpi Marittime (AM1, AM2 e AM3), che formano un gruppo separato dalle altre tre popolazioni (AM4, AM5 e AM6). Il cluster che riunisce complessivamente le popolazioni delle Alpi marittime (AM) e due popolazioni appenniniche risulta nettamente separato dai cluster che riuniscono tutte le altre popolazioni esaminate.
- Le popolazioni pirenaiche PY1, PY2, PY3, PY4 e PY5 si raggruppano tra di loro, mentre PY6 risulta più distante,
- Le popolazioni delle Alpi centro-orientali (AL) risultano abbastanza simili tra di loro e formano due gruppi (AL1, AL2, AL3 e AL4 – AL5, AL6, AL7, AL8 e AL9) rispecchiando la posizione geografica (Figura 8.7). La popolazione AL10 risulta sia geograficamente che geneticamente più distante.

Una considerazione a parte meritano invece le popolazioni AL11 e AL12 che rappresentano popolazioni di siti dove, oltre ad essere presente *Rhododendron ferrugineum* sono presenti anche le altre due specie, *Rhododendron hirsutum* e l'ibrido *Rhododendron x intermedium*. La popolazione AL11 clusterizza con le popolazioni AL1, AL2, AL3 e AL4 geograficamente vicine mentre AL12 risulta geneticamente molto distante dalle popolazioni geograficamente limitrofe.

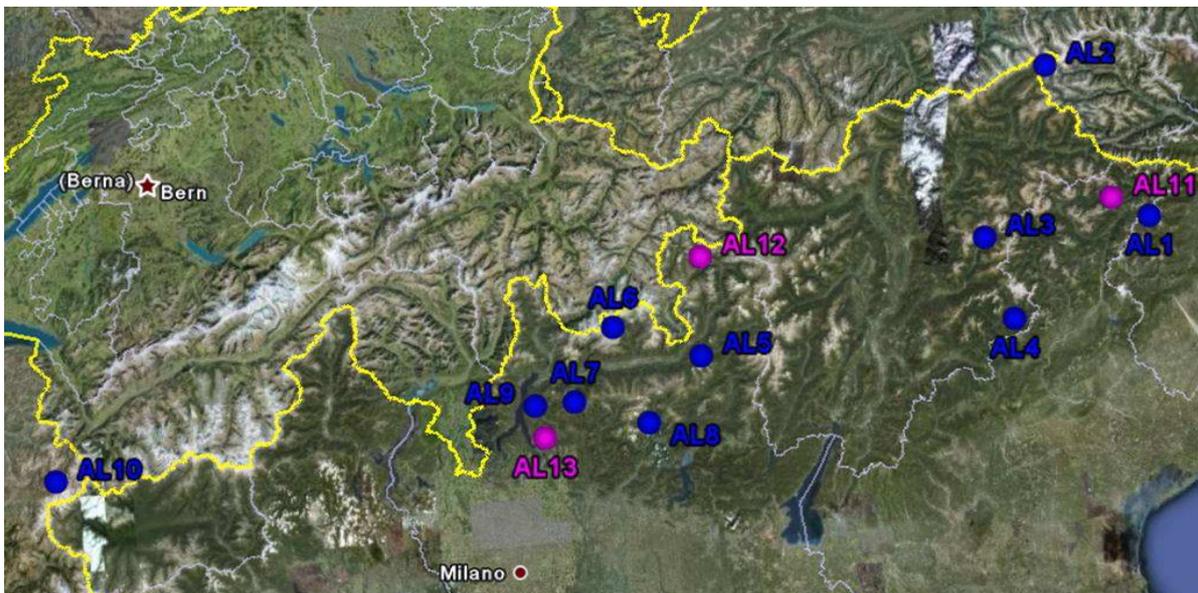


Figura 8.7 Distribuzione delle popolazioni alpine campionate. In viola i siti dove è stato campionato anche *Rhododendron x intermedium*.

Per meglio investigare le relazioni tra le popolazioni campionate, è stato utilizzato anche un approccio a livello di individuo. Sono stati analizzati i profili SSR mediante il software STRUCTURE tramite 10000 interazioni MCMC (Markov Chain Monte Carlo) dopo un periodo di burn-in di 10000 interazioni, senza dare informazioni precedenti sull'origine degli individui assegnati alle varie popolazioni. In questo caso i valori ottimali di K sono risultati essere K=4 e K=7 (Figura 8.8).



Figura 8.8 Grafico rappresentante la relazione tra K e $\Delta\ln$ per la scelta di K nella structure analysis delle 27 popolazioni analizzate.

La structure analysis con K=4 (Figura 8.9 in alto) non evidenzia una netta separazione tra le zone geografiche in cui sono state campionate gli individui analizzati. Infatti:

- gli individui delle popolazioni AP1 e AP3 raggruppano insieme a quelli delle popolazioni AM1, AM2 e AM3,
- gli individui delle popolazioni AM4, AM5 e AM6 raggruppano insieme agli individui delle popolazioni PY1, PY2, PY3, PY4, PY5, AL5 e AL10,
- gli individui delle popolazioni AL1, AL2, AL3 e AL4 raggruppano insieme agli individui delle popolazioni AL11 e AL12,
- gli individui appartenenti alla popolazione AP2 sono simili ai campioni delle popolazioni PY6, AL6, AL7, AL8 e AL9.

Invece la structure analysis con K=7 (Figura 8.9 in basso) meglio rispetta la differenziazione geografica delle popolazioni, rispecchiando i risultati della cluster analysis:

- gli individui delle popolazioni AP1 e AP3 si raggruppano tra di loro,
- gli individui delle sei popolazioni delle Alpi Marittime (AM) formano un gruppo separato rilevando però alcune similarità con le popolazioni AP1 e AP3,
- le popolazioni pirenaiche (PY) formano un altro gruppo ma anch'esse evidenziano similarità con le popolazioni alpine (in particolare gli individui della popolazione PY6),
- gli individui della popolazione AP2 raggruppano con alcuni individui appartenenti alle popolazioni AL6, AL7, AL8 e AL9,
- le popolazioni delle Alpi centro-orientali presentano una differenziazione interna in cui si evidenzia la collocazione geografica delle popolazioni: AL1, AL2, AL3 e AL4 sono simili alla popolazione AL11; AL5, AL6, AL7, AL8, AL9 e AL10 risultano avere una struttura genetica più o meno simile. Gruppo a parte è rappresentato dagli individui appartenenti alla popolazione AL12.

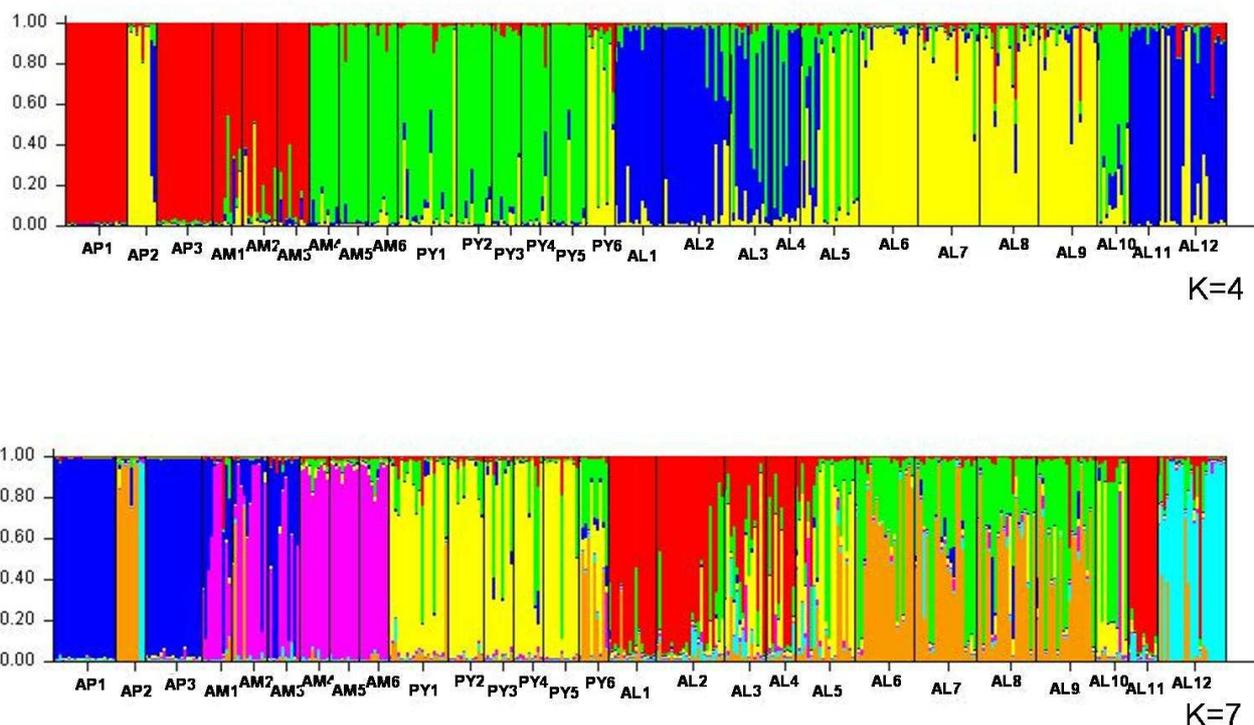


Figura 8.9 Structure analysis delle 27 popolazioni analizzate con i 6 loci SSR.

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stata utilizzata per analizzare la struttura genetica delle popolazioni studiate (Tabella 8.9).

L'analisi gerarchica ha mostrato che la maggior parte della variazione genetica (66.44%) è dovuta alla variazione all'interno delle popolazioni. Significative risultano anche le variazioni "tra popolazioni all'interno dei gruppi" (21.08%) e "tra gruppi" (12.48%).

Anche in questo caso i gruppi sono stati definiti in base alla distribuzione geografica delle popolazioni: Appennini, Pirenei, Alpi Marittime e Alpi centro-orientali. I dati suggeriscono una significativa differenziazione della specie oggetto di studio a livello di popolazione nell'areale.

	Gradi di libertà	Variazione totale (%)	Indici di fissazione	P-value
Fra gruppi	3	12.48	$F_{CT} = 0.34$	<0.001
Fra popolazioni all'interno di gruppi	23	21.08	$F_{SC} = 0.24$	<0.001
All'interno delle popolazioni	763	66.44	$F_{ST} = 0.12$	<0.001

Tabella 8.9 Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA per 395 individui raggruppati in 27 popolazioni provenienti da tre regioni geografiche diverse. I risultati provengono da 1023 permutazioni.

8.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica delle popolazioni di *Rhododendron x intermedium*

Prima di procedere alla caratterizzazione genetica delle popolazioni di *Rhododendron x intermedium* si è proceduto all'identificazione integrata (morfologica e molecolare) di tutti gli individui campionati nelle tre popolazioni (AL11, AL12 e AL13) in cui sono risultati presenti gli individui ibridi.

8.2.1 Identificazione molecolare delle specie di *Rhododendron L.*

Per l'identificazione dal punto di vista molecolare delle specie oggetto di studio (*Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron hirsutum* e l'ibrido *Rhododendron x intermedium*) sono stati utilizzati alcuni marcatori molecolari filogenetici, plastidiali (indicati dalla tecnica DNA barcoding) e nucleari.

In particolare l'utilizzo del marcatore filogenetico nucleare ITS ha permesso di identificare con precisione le tre specie. Infatti, l'analisi delle sequenze ha evidenziato come le tre specie si differenzino per 1 singola base nucleotidica (Figura 8.10). Nella posizione 256 *Rhododendron*

ferrugineum ha una guanina (G – picco nero), *Rhododendron hirsutum* ha un'adenina (A – picco verde) mentre *Rhododendron x intermedium* presenta un polimorfismo con la presenza di entrambi i picchi (R). Essendo lo spaziatore ITS nucleare e quindi con ereditarietà sia materna che paterna, si è potuto dimostrare che *Rhododendron x intermedium* è realmente l'ibrido dato dall'incrocio di *Rhododendron ferrugineum* e *Rhododendron hirsutum*.

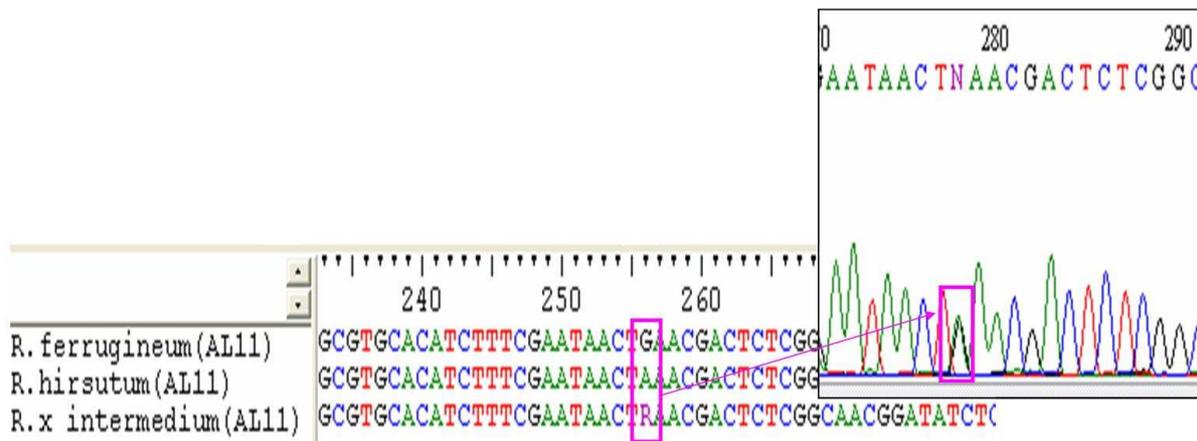


Figura 8.10 Sequenze ed elettroferogramma mostranti il polimorfismo che evidenzia come *Rhododendron x intermedium* derivi dall'ibridizzazione di *R. ferrugineum* e *R. hirsutum*.

L'altro marcatore filogenetico nucleare utilizzato At103 non è risultato un buon marcatore in quanto ha mostrato numerosi problemi come:

- difficoltà nell'amplificazione,
- difficoltà nel sequenziamento,
- difficoltà nell'allineamento,
- bassa discriminazione tra le tre specie,
- problemi di forme paraloghe o sequenze doppie.

Sono quindi stati utilizzati i marcatori filogenetici matK e psbA-trnH. Il gene matK è risultato di nessuna significatività in quanto non discrimina le tre specie prese in esame; le sequenze che si ottengono, di 850 bp, non si differenziano in nessun punto l'una dall'altra.

Lo spaziatore plastidiale psbA-trnH ha invece evidenziato 8 polimorfismi di cui uno in posizione 263, è risultato molto significativo (Figura 8.11). La presenza della base timina (T – picco rosso) sia in *Rhododendron hirsutum* che in *Rhododendron x intermedium*, essendo il plastidio di ereditarietà materna nelle Angiosperme, indica come nell'incrocio per formare l'ibrido, il *Rhododendron ferrugineum* sia l'individuo di sesso maschile mentre il *Rhododendron hirsutum* sia l'individuo di sesso femminile.

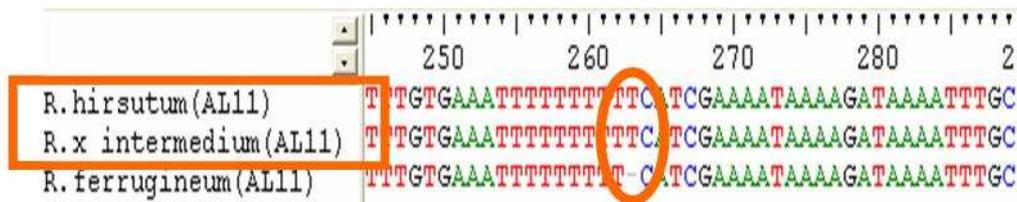


Figura 8.11 Sequenze che mettono in luce come *R. hirsutum* nell'incrocio con *R. ferrugineum* per formare l'ibrido, rappresenti l'individuo femminile.

8.2.2 Analisi degli sciami ibridi

Identificati gli ibridi ed i parentali mediante l'utilizzo combinato dei marcatori ITS e psbA-trnH (Figura 8.12), si è proceduto agli studi di genetica di popolazione per l'analisi degli sciami ibridi mediante l'utilizzo dei marcatori molecolari SSR (microsatelliti).

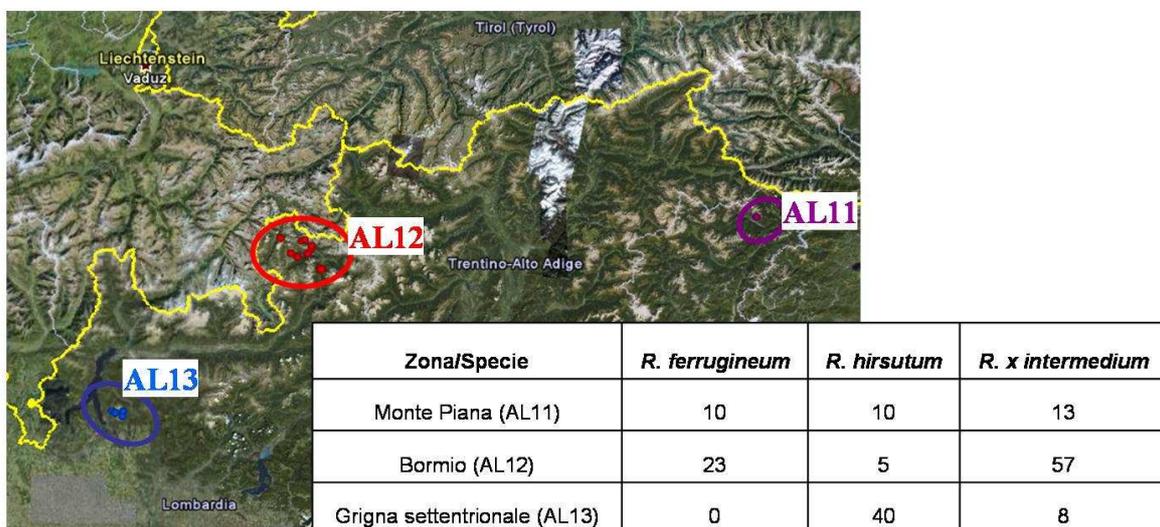


Figura 8.12 Le 3 popolazioni in cui sono stati campionati individui di *R. ferrugineum*, *R. hirsutum* e *R. x intermedium*.

Analisi Monte Piana (Popolazione AL11)

L'analisi degli individui appartenenti alle tre specie campionate sul Monte Piana è stata eseguita utilizzando i marcatori microsatelliti già utilizzati per la caratterizzazione genetica di *Rhododendron ferrugineum* nel suo areale. Sono stati caratterizzati 33 individui; l'analisi mediante il software STRUCTURE ha permesso di identificare gli individui appartenenti alle tre specie ma come si evince dalla Figura 8.13 alcuni individui identificati come *Rhododendron x intermedium* in realtà non sono ibridi di prima generazione (F_1) ma derivano da fenomeni di introgressione ovvero il re-incrocio dell'ibrido con uno dei due parentali. In questo caso si vede come l'introgressione sia maggiore nei confronti di *Rhododendron hirsutum*.

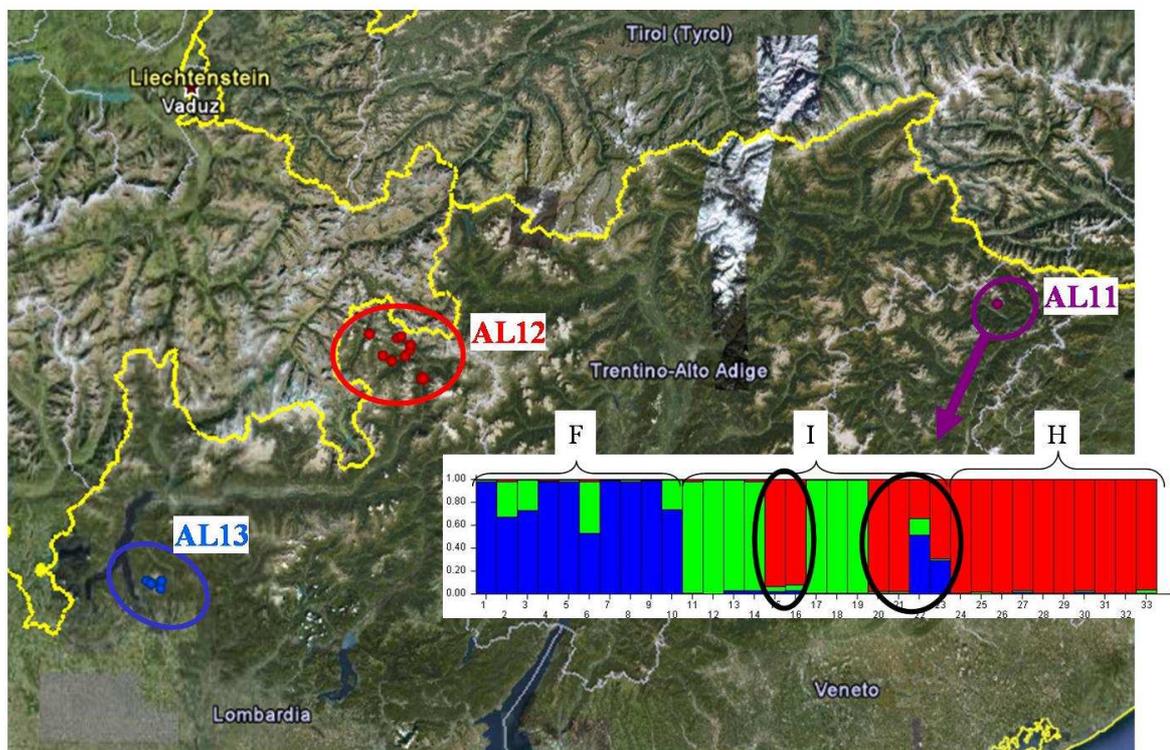


Figura 8.13 Structure analysis degli individui campionati nella popolazione AL11.

Analisi Bormio (Popolazione AL12)

Nell'area di Bormio sono stati caratterizzati un totale di 85 individui attraverso l'utilizzo dei 6 marcatori microsatelliti SSR. Gli individui sono stati campionati in 8 sottopopolazioni limitrofe.

La structure analysis (Figura 8.14) mette in luce la presenza di individui parentali puri, di individui di prima generazione ed individui di generazioni successive caratterizzati da fenomeni di introgressione nei confronti di entrambi i parentali, evidenziando quindi la presenza di un iniziale sciame ibrido.

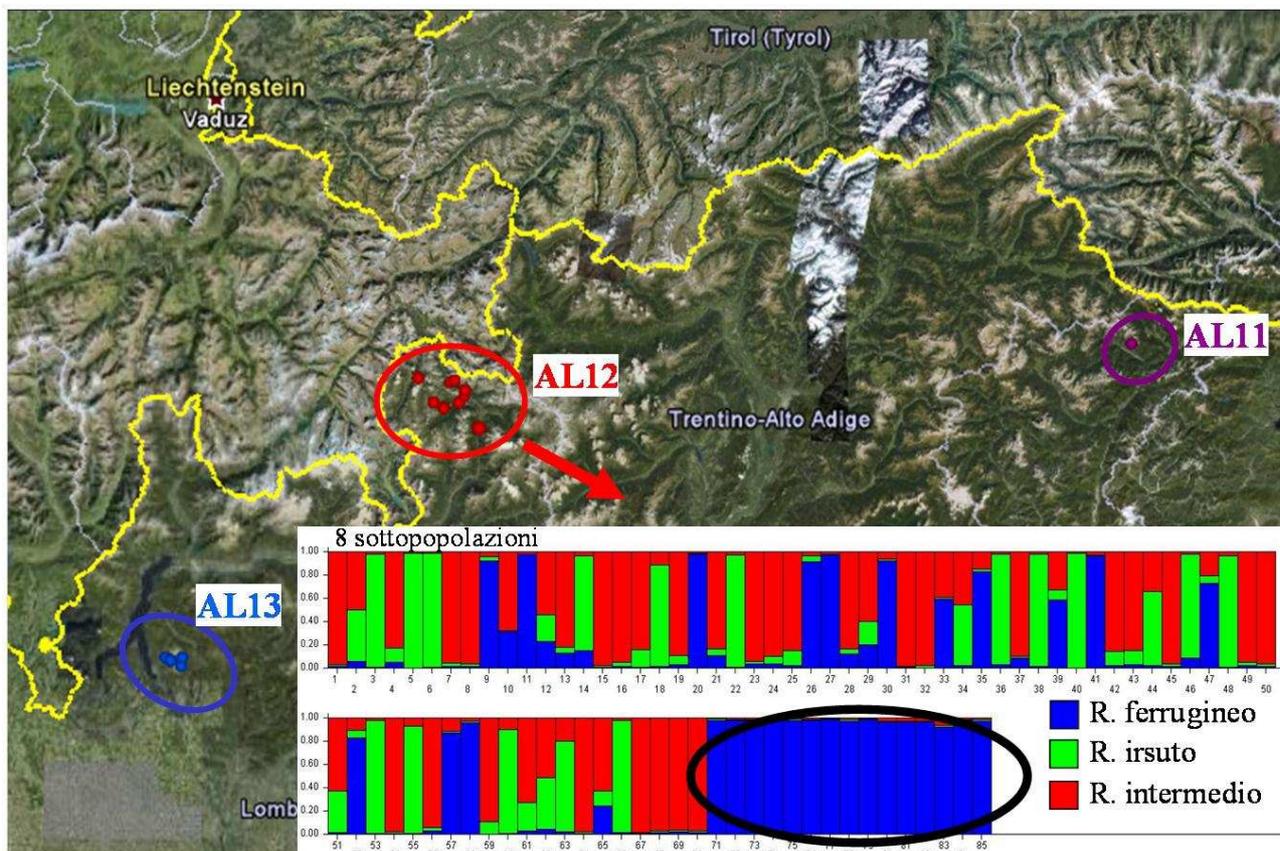


Figura 8.14 Structure analysis degli individui campionati nella popolazione AL12.

Analisi Grigna settentrionale (Popolazione AL13)

Sono state campionate 5 sottopopolazioni per un totale di 48 individui risultati appartenenti alle specie *Rhododendron hirsutum* e *Rhododendron x intermedium*. La caratterizzazione mediante i microsatelliti e la conseguente structure analysis (Figura 8.15) evidenzia la presenza di uno sciame ibrido ormai presente da molto tempo, in cui non sono più distinguibili le linee parentali pure.

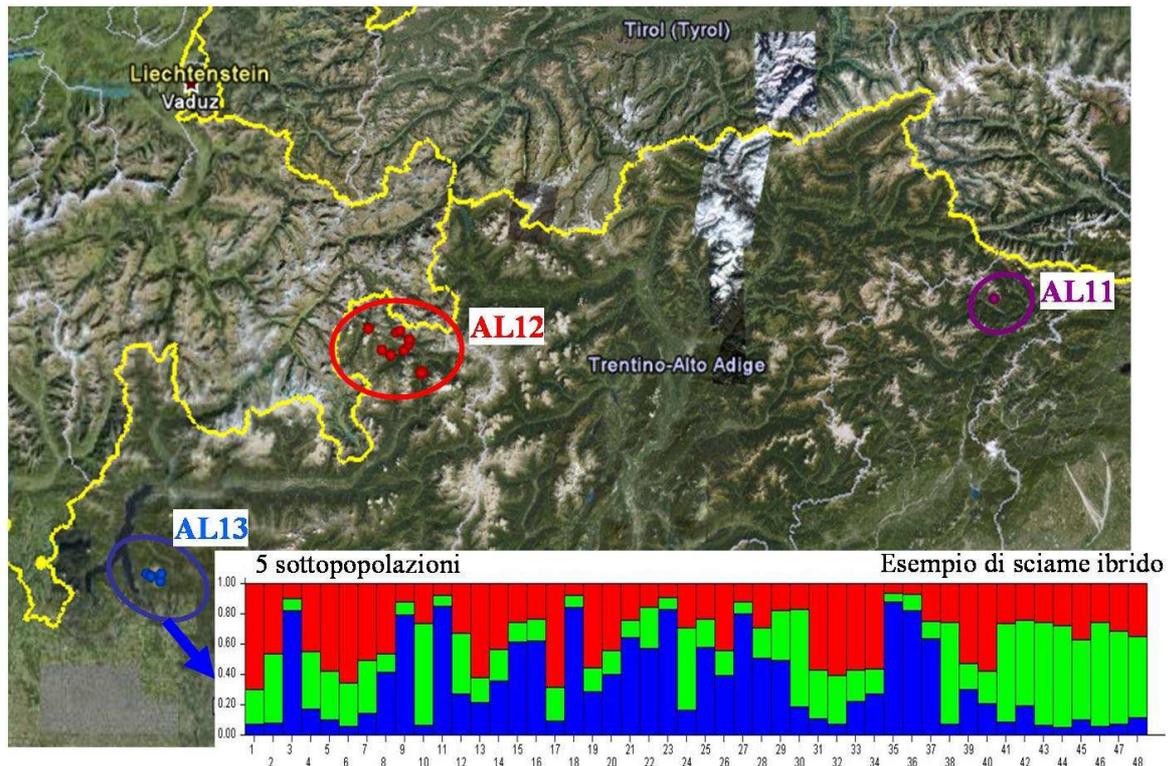


Figura 8.15 Structure analysis degli individui campionati nella popolazione AL13.

8.2.3 Variabilità delle popolazioni di *Rhododendron x intermedium*

Gli individui di *Rhododendron x intermedium* campionati nelle tre stazioni (AL11, AL12 e AL13) sono stati analizzati mediante sei loci micro satellite: RodA, RodC, RodD, RodE, RodH e RodI. Anche in questo caso tutti i loci sono risultati polimorfici (Tabella 8.10) rivelando un totale di 77 alleli in 108 individui appartenenti alle tre popolazioni analizzate. Il numero di alleli per locus varia da 6 (locus RodC) a 20 (locus RodD) con una media di 12.83 alleli per locus. Per ogni locus è stata calcolata la diversità genetica in termini di eterozigotità attesa (H_e). La media mostra un intervallo ristretto con valori compresi tra 0.68 (locus RodC) e 0.89 (locus RodA).

Nei campioni analizzati sono stati evidenziati un elevato numero di alleli privati: 35, il 45.5% del totale (Tabella 8.11).

SSR loci	Na	A _[26]	Ho	He	Fis
RodA	16	8.71	0.73	0.89	0.05
RodC	6	4.19	0.37	0.68	0.29
RodD	20	7.83	0.55	0.88	0.10
RodE	9	6.66	0.67	0.86	0.10
RodH	15	7.67	0.48	0.86	0.12
RodI	11	5.99	0.36	0.74	0.06

Tabella 8.10 Dettagli dei loci SSR utilizzati per l'analisi delle 3 popolazioni di *Rhododendron x intermedium*. Na: numero di alleli per ogni locus, Ho: eterozigosità osservata, He: eterozigosità attesa, Fis: indice di fissazione.

Anche l'ibrido *Rhododendron x intermedium* può riprodursi per via vegetativa; è quindi stata indagata la presenza di individui clonali nelle tre popolazioni.

Sono risultate avere individui clonali la popolazione AP11 (1 gruppo con tre individui clonali e 1 gruppo con due individui clonali) e la popolazione AL12 (1 gruppo con due individui clonali). Per ogni gruppo di cloni è stato considerato un solo individuo per il calcolo dei coefficienti di inbreeding al fine di non alterare i risultati.

I valori dei parametri di diversità genetica intra-popolazione come la ricchezza allelica (A[26]), l'eterozigosità osservata (Ho) e attesa (He), il coefficiente di inbreeding (Fis) e la diversità genetica (GD) delle tre popolazioni analizzate sono indicate nella Tabella 8.12.

Popolazione	Locus	Allele	Frequenza
AL11	RodD	152	0.12
AL11	RodD	154	0.12
AL11	RodI	224	0.08
AL11	RodI	228	0.04
AL11	RodI	232	0.12
AL12	RodA	64	0.06
AL12	RodA	66	0.01
AL12	RodA	72	0.12
AL12	RodA	89	0.08
AL12	RodA	93	0.01
AL12	RodA	97	0.01
AL12	RodC	298	0.14
AL12	RodD	129	0.03
AL12	RodD	138	0.02
AL12	RodD	140	0.14
AL12	RodD	156	0.07
AL12	RodD	158	0.01
AL12	RodD	179	0.13
AL12	RodD	181	0.01
AL12	RodD	183	0.01
AL12	RodH	127	0.05
AL12	RodH	133	0.05
AL12	RodH	169	0.02
AL12	RodH	175	0.13
AL12	RodH	189	0.02
AL12	RodI	213	0.04
AL12	RodI	219	0.02
AL12	RodI	222	0.02
AL13	RodC	294	0.06
AL13	RodD	150	0.22
AL13	RodD	169	0.04
AL13	RodD	173	0.01
AL13	RodD	194	0.05
AL13	RodE	120	0.05
AL13	RodH	167	0.08

Tabella 8.11 Frequenza e localizzazione degli Alleli privati presenti in ogni popolazione analizzata.

Pop	N. campioni	N_a	$A_{[26]}$	H_o	H_e	F_{IS}	PA	GD
AL11	13	5.83	5.83	0.58	0.71	0.20	5	0.71
AL12	56	10.50	7.52	0.53	0.80	0.34	23	0.80
AL13	39	7.00	5.80	0.51	0.84	0.30	7	0.72

Tabella 8.12 Parametri di diversità genetica considerati e loro valori. $A_{[16]}$, ricchezza allelica H_o : eterozigosità osservata, H_e : eterozigosità attesa; F_{IS} : coefficiente di inbreeding e GD: diversità genetica.

In tutte e tre le popolazioni la diversità genetica risulta molto alta (media 0.74), diretta conseguenza della presenza di numerosi alleli privati e della più recente formazione di queste popolazioni ibride.

L'analisi della struttura delle tre popolazioni è stata effettuata mediante il software STRUCTURE. Dall'immagine ottenuta (Figura 8.16) con $K=5$, si distinguono le tre zone geografiche (Monte Piana, Bormio e Grigna settentrionale) in quanto caratterizzate da alleli diversi (questo rispecchia la presenza in ogni popolazione di numerosi alleli privati).

Le popolazioni AL11 (Monte Piana) e AL13 (Grigna settentrionale) risultano più omogenee ovvero caratterizzate da ibridi fissati.

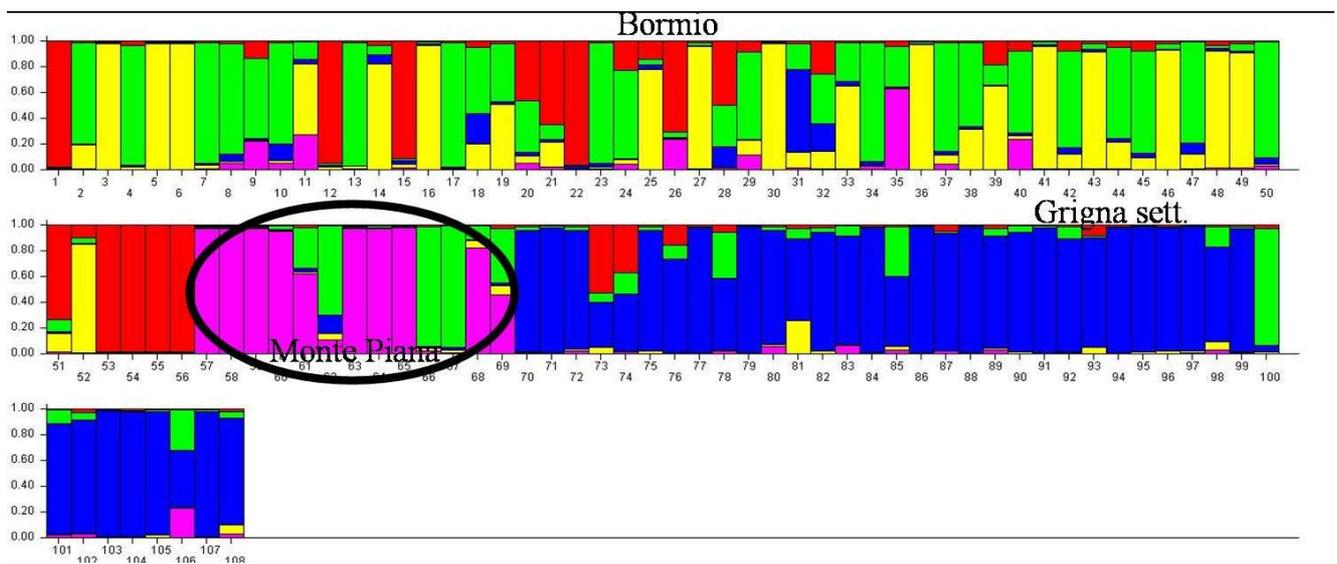


Figura 8.16 Structure analysis degli individui appartenenti alle 3 popolazioni analizzate con i 6 loci SSR.

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) ha mostrato che la maggior parte della variazione genetica (61.34%) è dovuta alla variazione tra gli individui delle tre popolazioni (Tabella 8.13). Significativa anche la variazione genetica all'interno delle singole popolazioni (27.66%) mentre abbastanza bassa risulta la % di variazione tra le tre popolazioni (10.99%).

	Gradi di libertà	Variazione totale (%)	Indici di fissazione	P-value
Fra popolazioni	2	10.99	$F_{ST} = 0.11$	<0.001
Fra individui all'interno delle popolazioni	105	27.66	$F_{IS} = 0.31$	<0.001
Fra individui	108	61.34	$F_{IT} = 0.39$	<0.001

Tabella 8.13 Risultati dell'analisi gerarchica AMOVA per i 108 individui raggruppati in 3 popolazioni. I risultati provengono da 1023 permutazioni.

Conclusioni

Capitolo 9

Conclusioni

9.1 Obiettivo I: Caratterizzazione genetica delle popolazioni sud-europee di *Rhododendron ferrugineum* L.

L'analisi della specie *Rhododendron ferrugineum* L. mediante i marcatori microsatelliti suggerisce che nelle popolazioni Appenniniche la propagazione clonale ed il fenomeno dell'inbreeding abbiano portato ad una bassa variabilità genetica e, di conseguenza, ad una deriva genica.

La diversità genetica viene influenzata da molteplici fattori, sia positivi (incrocio tra individui diversi, flusso genico tra popolazioni) sia negativi (inbreeding, isolamento genetico, riduzione del numero di individui). In popolazioni ampie e numerose si raggiunge un equilibrio tra tutti questi fattori e generalmente si hanno popolazioni con una buona diversità genetica. Nelle popolazioni piccole e isolate, come quelle degli Appennini, invece prevalgono i fattori negativi primi tra tutti l'autofecondazione e l'inbreeding che portano alla perdita di variabilità genetica. Le analisi hanno dimostrato che nelle popolazioni appenniniche vi è una bassa diversità genetica, pochi alleli e soprattutto elevati livelli di fissazione allelica. Nelle popolazioni si è inoltre osservata una diminuzione dell'eterozigosità osservata in confronto a quella attesa, con la presenza di loci monomorfici da ricollegare all'autofecondazione e all'isolamento geografico tra i diversi campioni di *Rhododendron ferrugineum* L. che impedisce lo scambio di polline – assicurato prevalentemente da bombi - anche tra individui della stessa popolazione. Questo è ampiamente documentato in letteratura (Wolf et al., 2004) e a questo si aggiunge il fenomeno della propagazione clonale che determina la formazione di individui tutti identici. Nelle popolazioni piccole, caratterizzate da individui con poche gemme e pochi fiori, come quelle osservate nelle popolazioni appenniniche, l'incrocio è ridotto mentre si rileva un elevato livello di autoimpollinazione e la crescita clonale.

Sulla base di indagini archeobotaniche le popolazioni di *Rhododendron ferrugineum* dell'Appennino settentrionale derivano da un'espansione, avvenuta durante il Pleistocene, della stessa specie presente sulle vicine Alpi Marittime (Ferrarini, 1973). È però significativo il fatto che solamente la popolazione più grande (AP1) abbia una costituzione genetica più simile a quella delle popolazioni delle Alpi Marittime.

L'altra popolazione appenninica (AP2), invece, risulta più simile alle popolazioni delle Alpi centro-orientali.

Si può pensare che questi caratteri derivino da un'antica origine delle popolazioni appenniniche da quelle alpine, attraverso il "corridoio" delle alpi Marittime. Le vicende climatiche successive e la morfologia dei siti appenninici hanno portato successivamente ad una buona conservazione della popolazione del Libro Aperto (AL1) che risulta essere la più ricca di individui e, all'opposto, alla sopravvivenza di pochissimi individui negli altri siti. Questi fatti hanno influito sulla conservazione della diversità genetica, che si è relativamente conservata nella popolazione più grande, favorendo fenomeni di deriva genetica (gli effetti del caso) e aumentando gli effetti della riproduzione clonale nelle popolazioni piccolissime degli altri due siti.

Attualmente, le piccole e piccolissime popolazioni appenniniche sono il risultato della scarsità di siti favorevoli, in particolare dove il manto nevoso non è abbastanza durevole e non è di spessore sufficiente per proteggere le gemme dal congelamento (Ferrari e Piccoli, 1997; Körner, 2003).

Anche i forti venti (4 m/s) a cui le pendici dell'Appennino settentrionale sono particolarmente esposte (Zanella, 1989) hanno un effetto negativo sulla crescita di *Rhododendron ferrugineum*. Questo può essere dedotto dalle caratteristiche morfologiche che caratterizzano le tre popolazioni Appenniniche: piante di piccola taglia, presenza di poche gemme per pianta e crescita prostrata. Queste caratteristiche, unitamente ai dati molecolari ottenuti, suggeriscono che la vulnerabilità delle popolazioni appenniniche è principalmente legata alla rarità locale di habitat idonei. Le caratteristiche morfologiche sviluppate dalle piante locali hanno un alto valore adattativo, tuttavia davanti a questi effetti negativi delle condizioni climatiche è possibile ipotizzare che reintroduzioni locali anche consistenti potrebbero non produrre alcun risultato.

Nel prossimo futuro è probabile che il cambiamento climatico indurrà un ulteriore declino degli habitat adatti per *Rhododendron ferrugineum* sull'Appennino settentrionale (nonostante queste zone rientrino nelle aree protette) con un crescente rischio di estinzione delle popolazioni locali.

La maggior parte degli individui nord appenninici di *Rhododendron ferrugineum* si trovano attualmente nelle brughiere ad arbusti nani dominate da *Vaccinium gaultherioides* e *Vaccinium myrtillus*. Per quanto sia sa sull'ecologia di questa vegetazione (Ferrari e Piccoli, 1997), una durata più breve e uno spessore inferiore della copertura nevosa, unitamente agli effetti limitanti dei forti

venti, potrebbero favorire popolazioni più dense di *Vaccinium gaultheroides* e *Vaccinium myrtillus*, competitori di *Rhododendron ferrugineum*, riducendo ulteriormente i siti disponibili per questa specie (Bianco e Boulard, 1974).

Questo è il principale motivo per cui una strategia di conservazione in situ non sembrerebbe la soluzione ideale. La costituzione genetica di queste popolazioni periferiche, con i rispettivi alleli privati, suggerisce che l'obiettivo principale di una buona strategia di conservazione sia quello di preservare il più possibile la variabilità genetica mediante un sistema ex situ basato su banche del seme oppure coltivazione in aree controllate.

Le analisi condotte hanno evidenziato che anche le popolazioni pirenaiche, anch'esse periferiche nella distribuzione della specie, presentano gli stessi problemi di conservazione delle popolazioni appenniniche. Anch'esse infatti, presentano individui clonali oltreché una diversità genetica bassa. Queste sono caratteristiche tipiche delle popolazioni che si trovano al margine dell'areale.

Al contrario le popolazioni delle Alpi presentano un livello di diversità genetica buono, non presentano individui clonali, le popolazioni sono abbastanza numerose e morfologicamente non hanno un aspetto prostrato anche grazie alle condizioni climatiche favorevoli ancora presenti in queste zone.

9.2 Obiettivo II: Caratterizzazione genetica di *Rhododendron x intermedium* Tausch

Nell'ambito del presente progetto di dottorato sono stati messi a punto dei marcatori molecolari che hanno permesso di distinguere le specie parentali dall'ibrido *Rhododendron x intermedium*. In particolare lo spaziatore nucleare ITS ha permesso di dimostrare che *Rhododendron x intermedium* è realmente un ibrido dato dall'incrocio di *Rhododendron ferrugineum* con *Rhododendron hirsutum*. Mentre lo spaziatore plastidiale psbA-trnH, essendo di ereditarietà materna, ha permesso di dimostrare che nell'incrocio che origina l'ibrido, il *Rhododendron hirsutum* rappresenta il parentale femminile mentre *Rhododendron ferrugineum* è il parentale maschile.

Di particolare importanza è stata l'integrazione della classificazione morfologica con quella molecolare sia nella fase di campionamento che di analisi dei campioni. I caratteri fogliari sono sicuramente quelli più indicativi e la presenza di condizioni intermedie permettevano di individuare i presunti ibridi poi confermati a livello molecolare.

Per studiare le dinamiche di ibridazione sono stati usati marcatori codominanti ed in particolare microsatelliti nucleari. Dai dati si evidenzia come nelle zone del Monte Piana e di Bormio, unitamente alle linee parentali pure, siano presenti sciami ibridi ovvero ibridi di più generazioni che a volte possono derivare da re-incroci con uno dei due parentali (fenomeno dell'introggressione). In questo caso si è visto come il re-incrocio avvenga principalmente nei confronti di *Rhododendron hirsutum* (Milne, 2008). Questo fenomeno può essere spiegato in base alla fenologia della fioritura di queste specie: la fioritura di *Rhododendron ferrugineum*, infatti, non è contemporanea a quella delle altre due specie: in particolare, il periodo dell'antesi è generalmente successivo. Questo fatto è significativamente legato ad una differente distribuzione latitudinale. L'ibrido tende ad occupare quote più basse rispetto al limite degli alberi, coesistendo così maggiormente con *Rhododendron hirsutum* piuttosto che con l'altro parentale, che si trova invece prevalentemente oltre il limite degli alberi.

La popolazione della Grigna settentrionale è invece costituita da un unico sciame ibrido in cui non sono più distinguibili le linee parentali pure e questo è evidente anche dal punto di vista morfologico. Questo può essere spiegato con le limitate variazioni altitudinali e spaziali delle due specie in questa area e quindi con una maggiore probabilità di reincrocio..

L'analisi della struttura genetica delle tre popolazioni in cui sono risultate presenti le tre entità di *Rhododendron*, si è notata la presenza di un'alta diversità genetica dovuta anche a una grande variabilità allelica con la presenza di una buona percentuale di alleli privati.

Nelle popolazioni analizzate, la presenza dell'ibrido è predominante rispetto a quella dei parentali, probabilmente legata al fenomeno del vigore ibrido.

Due specie affini come *Rhododendron ferrugineum* L. e *Rhododendron hirsutum* L., entrambe ecologicamente esigenti, hanno trovato vantaggioso incrociarsi, producendo un ibrido sicuramente in grado di adattarsi meglio ai cambiamenti perché con caratteristiche derivanti da rimescolamento genico. *Rhododendron x intermedium* Tausch, infatti, è ecologicamente meno esigente dei parentali, riuscendo a sopravvivere su suoli con differenti pH e ad altitudini diverse. Proprio questa maggiore resistenza può però diventare una minaccia per gli individui parentali: l'ibrido infatti si diffonde e amplia il suo areale, a discapito di quello dei parentali. Considerando che *Rhododendron ferrugineum* L. e *Rhododendron hirsutum* L. sono due specie ad areale ridotto, esiste l'effettivo rischio che l'ibrido le soppianti, contaminando tutte le popolazioni pure.

In un'ottica di conservazione, quindi, bisognerebbe tenere conto dei fenomeni di ibridazione, della formazione di sciami ibridi nonché del fenomeno di introgressione, cercando di evitare o almeno ridurre le azioni di disturbo ambientale che portino alla coesistenza di specie interfertili.

Bibliografia

- Abeli T., Gentili R., Rossi G., Bedini G. e Foggi B., 2009. Can the IUCN criteria be effectively applied to peripheral isolated plant populations? *Biodiversity and Conservation* 18: 3877–3890.
- Aeschimann D., Lauber K., Mauser D.M., Theurillat J.P. *Flora Alpina*, Belin, Paris, 2004, 3 vol.
- Akagi, H., Yokozeki Y., Inagaki A. e Fujimura T., 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 61–67.
- Alessandrini A., Bonafedele F., 1996. *Atlante della Flora protetta della Regione Emilia-Romagna*. Regione Emilia-Romagna, Assessorato Territorio, Programmazione e Ambiente, Bologna.
- Alessandrini A., Foggi B., Rossi G., Tomaselli M., 2003. *La flora di altitudine dell'Appennino Tosco-Emiliano*. Regione Emilia-Romagna.
- Anderson E. e Hubricht L., 1938. Hybridization in *tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany* 25: 396-402.
- Anderson E., 1948. Hybridization of the habitat. *Evolution* 2: 1-9.
- Anderson E., 1949. *Introgressive Hybridization*. John Wiley, New York.
- Ansaldi M., Cassettari A. e Adami M., 2003. *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae), specie nuova per la flora Apuana. *Atti Soc. tosc.Sci.nat.,Mem., Serie B*, 110 pag.189-191,fig 1, tab 1.
- Arnold M.L. e Hodges S.A., 1995. The fitness of hybrids – A response to Day and Schluter. *Trends in Ecology&Evolution* 10: 289.
- Arnold M.L., 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Ashley C.T. e Warren S.T., 1995. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Review of Genetics* 29: 703-728.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. e Donoghue, M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247–277.

-
- Barcaccia G., Lucchin M. e Parrini P., 2000. Analisi del genoma mediante marcatori molecolari. *Sementi Elette* 5: 5-23.
 - Barton N.H. e Hewitt G.M., 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology Systematics* 16: 113-148.
 - Barton N.H., 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551-568.
 - Becker J. e Heun M., 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* 27(4): 835-845.
 - Bianco J. e Bulard C., 1974. Etude de la germination des graines de *Rhododendron ferrugineum* L. et de *Tofieldia calyculata* L. *Wahlnb. Travaux Scientifiques Parc Naturel de la Vanoise* V, 121-130.
 - Broennimann O., Vittoz P., Moser D. e Guisan A., 2005. Rarity types among plant species with high conservation priority in Switzerland. *Botanica Helvetica* 115: 95–108.
 - Broun P. e Tanksley S.D., 1993. Characterization of tomato DNA clones with sequence similarity to human minisatellites 33.6 and 33.15. *Plant Molecular Biology* 23 (2): 231-242.
 - Brown J. H., 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *American Naturalist* 124:255-279.
 - Case T.J., Holt R.D., McPeck M.A. e Keitt T.H., 2005. The community context of species' borders: ecological and evolutionary perspectives. *Oikos* 108:28–46.
 - Chamberlain D.F. e Rae S.J., 1990. A revision of *Rhododendron* IV subgenus *Tsutsusi*. *Edinburgh Journal of Botany* 47: 89-200.
 - Chamberlain D., et al., 1996. *The Genus Rhododendron: Its classification & synonymy*. Royal Botanic Garden. Edinbrurg.
 - Chamberlain D., 1982. A revision of *rhododendron* II. subgenus *Hymenanthes*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 39: 209-486.
 - Channell R., 2004. The conservation value of peripheral populations: the supporting science. In: Hooper T.D. (eds) *Proceedings of the species at risk 2004 pathways to recovery conference organizing committee*, Victoria.
 - Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., and Leon C., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel

-
- DNA Barcode for identifying medicinal plant species. PlosOne 5(1): eB613. doi:10.1371/journal.phone.0008613.
- Chiarugi A., 1936. Ricerche sulla vegetazione dell'Etruria marittima. III. – L'indigenato della "*Picea excelsa*" LK. nell'Appennino etrusco. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 43(1):131-166.
 - Clausen J., 1951. Stages in the Evolution of plant species. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
 - Comes H.C., J. Kadereit, 1998. The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. Trends Plant Science 3: 432–438.
 - Conradt L., 2001. Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. Nature 411: 577–581.
 - Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. Associazione Italiana per il WWF. Società Botanica Italiana, Università di Camerino, pp.139.
 - Cox P.A. e Cox K.N.E., 1997. The enciclopedia of *Rhododendron* species. Perth: Glendoick Publishing.
 - Cruzan M.B. and Arnold M.L., 1993. Ecological and genetic associations in an *Iris* hybrid zone. Evolution 47: 1432-1445.
 - Cruzan M.B. and Arnold M.L., 1993. Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone. Evolution 47: 1432-1445.
 - Cullen J., 1980. A revision of *Rhododendron* I. Subgenus *Hymananthes*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 39: 1-207.
 - Darwin C., 1859. The Origin of the Species. Washington Square Press, New York.
 - Della Beffa M.T., 1998. Conoscere, riconoscere e osservare tutte le specie di fiori alpini più diffuse. Fiori di Montagna. Istituto Geografico De Agostini, Pag. 199.
 - Despres, L., Gielly, L., Redoutet, W., Taberlet, P., 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. Molecular Phylogenetics and Evolution 27: 185–196.
 - Dobzhansky T., 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.

-
- Eisner et al., 1995. Building a Scientifically Sound Policy for Protecting Endangered Species. *Science* 269:1231-1232.
 - Ellenberg H., 1963. *Vegetation Mittle Europas mit den Alpen*. Ulmer, Stuttgart.
 - Ellstrand N.C., Whitkus R. e Rieseberg L.H. 1996 Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceeding of the National Academy of Science. USA* 93: 5090-5093.
 - Escaravage N., Flubacker E., Pornon A., Doche B., Till-Bottraud I., 2001. Stamen dimorphism in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae): development and function. *American Journal of Botany* 88(1): 68-75.
 - Escaravage N., Questiau S., Porton A., Doche B., Taberlet P., 1998. Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology* 7, 975-982.
 - Escaravage N., Wagner J., 2004. Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology* 6: 606-615.
 - Escaravage N., 1997. *Système de reproduction et stratégie de colonisation de Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) (Etage subalpin; Alpes du Nord)*. Thesis of University Joseph Fourier, Grenoble, France
 - Evanno G., Regnaut S. e Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
 - Excoffier L., Laval G. e Schneider S.. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1: 47-50.
 - Falk D.A., 1991. Joining biological and economic models of conserving plant genetic diversity. In: D.A. Falk, K.E. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, pp. 209-223.
 - Favarger C. and Galland N., 1996. Essai sur la diversité de la flore alpine. *Dissertationes Botanicae* 258: 13-29.
 - Ferrari C., Piccoli F., 1997. The ericaceous dwarf shrublands above the Northern Apennine timberline (Italy). *Phytocoenologia* 27: 53-76.
 - Ferrarini E., 1973. *Rhododendron ferrugineum* L. in fitocenosi relitte dell'Appennino settentrionale. *Giornale Botanico Italiano* 107: 104-156.

-
- Ferrarini E., 1974. Altre cenosi e stazioni relitte reperite sull'Appennino settentrionale (ad *Antennaria carpatica*, a *Rhododendron ferrugineum*, a *Salix herbacea*, a *Saussurea discolor*). *Webbia*, 29: 105-112.
 - Ferrarini E., 1977. Cenosi a "*Picea abies* (L.) Karst. " relitte sull'Appennino. *Acc. Ital. Sc. Forest.*, 26: 185-237.
 - Ferrarini E., 1979. Note Floristiche sull'Appennino Settentrionale (dal Passo della Cisa al passo delle Radici). *Webbia*: 29: 235-267.
 - Ferrarini E., 1979. Rodoreti del Monte Vecchio. Gruppo di lavoro per la Conservazione della Natura della Società Botanica Italiana. Camerino.
 - Ferrarini E., 1982. Carta della vegetazione dell'Appennino tosco-emiliano dal Passo delle Radici al passo delle Radici. Note illustrative. *Bollollettino Museo Lunigiana* 2: 5-25.
 - Fiedler P.L. and. Ahouse J.J., 1992. Hierarchies of cause: toward an understanding of rarity in vascular plant species. Pages 23-47 in P. L. Fiedler and S. K. Jain, editors. *Conservation Biology: the Theory and Practice of Nature Conservation, Preservation and Management*. Chapman & Hall, London.
 - Finkeldey R., Gregorius H.R., 1994. Genetic resources: selection criteria and design. In: Z.S. Kim, H. Hattemer (Eds.). *Conservation and manipulation of genetic resources in forestry*. Kwang Moon Kag publishing, Seoul.
 - Frankel O.H., 1976. Natural variation and its conservation. In: A. Muhammed, R. Aksel, R.C. von Borstel (Eds.). *Genetic Diversity in Plants*. Plenum, New York, pp. 21-44.
 - Fraser D.F., 2000. Species at the edge: the case for listing of "peripheral" species. In: Darling LM (ed) *Proceedings of a conference on the biology and management of species and habitats at Risk*, Kamloops, B.C., 1999 Volume One BC Ministry of Environment, Lands and Parks, Victoria, BC and University College of the Cariboo, Kamloops, BC
 - Fulton T.M., Van der Hoeven R., Eannetta N.T., Tanksley S.D., 2002. Identification, analysis and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell*, 14: 1457-1467.
 - Gao L.M., Li D.Z., Zhang C.Q. e Yang J.B., 2002. Infrageneric and sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) inferred from ITS sequence data. *Acta Botanica Sinica* 44: 1351-1356.

-
- Gapare WJ, Aitken SN, Ritland CE (2005) Genetic diversity of core and peripheral Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr) populations: implication for conservation of widespread species. *Biol Conserv* 123:113–123
 - Gaston, K. J. 1994. *Rarity*. Chapman & Hall, London.
 - Gilpin, M.E. and Soulè M.E., 1986. Minimum viable populations: process of species extinctions. Pages 19-34 in M.E. Soulè, editor. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - Goetsch L., Eckert A.J. e Hall B.D., 2005. The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): a phylogeny based upon RPB2 gene sequences. *Systematic Botany* 30: 616-626.
 - Gottlieb L.D., 1973. Genetic stability in a peripheral isolate of *Stephanomeria exigua* subsp. *coronaria* that fluctuates in population size. *Genetics* 76: 551–556.
 - Goudet J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
 - Grant V., 1966. Linkage between viability and fertility in a species cross in *Gilia*. *Genetics* 54: 867-880.
 - Grassi F., Labra M., Imazio S., Ocete Rubio R., Failla O., Scienza A., Sala F., 2006. Phylogeographical structure and conservation genetics of wild grapevine. *Conservation Genetics* 7: 837–845.
 - Gugerli, F., 1997. Hybridization of *Saxifraga oppositifolia* and *S. biflora* (Saxifragaceae) in a mixed Alpine Population. *Plant Systematic Evolution* 207: 255–272.
 - Guo S.W. e Thompson E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
 - Gupta P.K., Balyan I.S., Sharma P.C. e Ramesh B., 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science* 70(1): 45-54.
 - 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.
 - Harper J.L., 1981. The meanings of rarity. Pages 189-203 in H. Synge, editor. *The biological aspects of rare plant conservation*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
 - Heiser C.B., 1947. Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. Petiolaris*. *Evolution* 1: 249-262.

-
- Henderson P.A., Seaby R.M., 1999. Population stability of the sea snail at the southern edge of its range. *Journal of Fish Biology* 54:1161–1176.
 - Hengeveld R. and Haeck J., 1982. The distribution of abundance. I. Measurements. *Journal of Biogeography* 9:303-316.
 - Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S., Chatrou, L.W., 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758–1776.
 - Holt R.D., Keitt T.H., 2005. Species' borders: an unifying theme in ecology. *Oikos* 108: 3-6.
 - Howard D.J., 1986. A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. *Evolution* 40: 34-43.
 - Hughes, C.E., Eastwood, R.J., Bailey, C.D., 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361: 211–225.
 - Huntley B., 1991. How Plant respond to climate change: Migration rates, individualism and the consequences for plant communities, *Annals of Botany* 67: 15–22.
 - Judd W.S. e Kron K.A., 1995. A revision of *Rhododendron* VI subgenus *Pentanthera* (sections *Sciadorhodon*, *Rhodora* and *Viscidula*). *Edinburgh Journal of Botany* 52: 1-54.
 - Kadereit J., E.M. Griebeler, H.P., 2004. Comes, Quaternary diversification in European alpine plants: Pattern and processes, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359: 265–274.
 - Kim, K.J., Jansen, R.K., 1994. Comparisons of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): Additional information from internal transcribed
 - Kluth C., Bruehlheide H., 2005. Central and peripheral *Hornungia petraea* populations: patterns and dynamics. *Journal of Ecology* 93: 584–595.
 - Körner C., 2003. *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountains ecosystems*. 2nd edn. Springer, Berlin-Heidelberg.
 - Kron K.A. e Judd W.S., 1990. Phylogenetic relationships within the Rhodoreae (Ericaceae) with specific comments on the placement of *Ledum*. *Systematic Botany* 15: 57-68.
 - Kurashige Y., Ethon J.I., Handa T., Takayanagi K. e Yukawa E., 2001. Sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae): evidence from matK and trnK intron sequence. *Plant Systematics and Evolution* 228: 1-14.

-
- Lammi A., Siikamaki P., Mustajarvi K., 1999. Genetic diversity, population size, and fitness in central and peripheral populations of a rare plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology* 13: 1069-1078.
 - Lawton J.H., 1993. Range, population abundance and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 8:409–413.
 - Lesica P., Allendorf F.W., 1995. When are peripheral population valuable for conservation? *Conservation Biology* 9: 753–760.
 - Lesica P., McCune B., 2004. Decline of artic-alpine plants at the southern margin of their range following a decade of climatic warming. *Journal of Vegetable Science* 15: 679–690.
 - Lewontin R.C. e Birch L.C., 1966. Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. *Evolution* 20: 315-336.
 - Li H.B., Wang J., Liu A.M., Liu K.D., Zhang Q.F. and Zou J.S., 1997. Genetics of low-temperature-sensitive sterility in indica-japonica hybrids of rice as determined by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 1092-1097.
 - Li M., Wunder J., Bissoli G., Scarponi E., Gazzani S., Barbaro E., Saedler H., e Varotto C., 2008. Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics* 24: 727–745.
 - Losacco U., 1982. Gli antichi ghiacciai dell'Appennino Settentrionale. Studio morfologico e paleogeografico. *Atti Soc. Nat. Mat. Modena*, 113: 1-224.
 - Manel S., Berthoud F., Bellemain M., Gaudeul M., Luikart G., Swenson J.E., Waits L.P., Taberlet P., IntraBiodiv Consortium, 2007. A new individual-based spatial approach for identifying genetic discontinuities in natural populations. *Molecular Ecology* 16: 2031-2043.
 - Martinsen G.D., Whitam T.G., Turek R.J. e Kaim P., 2001. Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* 55: 1325-1335.
 - Mayer E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge.
 - Mayer E., 1992. A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany* 79: 222-238.
 - Mayr E., 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

-
- Millar C.I., Libby W.J., 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species In: D.A. Falk, K.E. Holsinger (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, pp. 149-170.
 - Milne R., Abbott R., 2008. Reproductive isolation among two interfertile *Rhododendron* species: low frequency of post-F1 hybrid genotypes in alpine hybrid zones. *Molecular Ecology* 17, 1108-1121.
 - Moore W.S., 1977. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review Biology* 52: 263-278.
 - Morgante M., Olivieri A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3(1): 175-182.
 - Mullis, K.B., and Faloona F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
 - Nathan, R., Safriel U.N, and Shirihai H., 1996. Extinction and vulnerability to extinction at distribution peripheries: an analysis of the Israeli breeding avifauna. *Israel Journal of Zoology* 42:361–383.
 - Nei M., Tajima F., Tateno Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.
 - O'Brien M. e Mayr E., 1991. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science* 251 (4998): 1187-1188.
 - Ozenda P., 2009. On the genesis of the plant population in the Alps: New or critical aspects. *C. R. Biologies* 332 (2009) 1092–1103
 - Ozenda P., 1990. La zone némorale xérotrophe sud-européenne. *Giornale botanico Italiano* 124: 759–780.
 - Ozenda P., *Perspectives pour une géobiologie des montagnes*, PPUR, Lausanne, 2002, 195 p.
 - Parolo G. e Rossi G., 2008. Upward migration of vascular plants following a climate warming trend in the Alps. *Basic and Applied Ecology* 9:100-107.
 - Parson P.A., 1990. The metabolic cost of multiple environmental stresses: implication for climatic change and conservation. *Trends of Ecology and Evolution* 5: 315–317.
 - Peakall R., Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

-
- Pelsner, P.B., Gravendeel, B., Van Der Meijden, R., 2003. Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Molecular Phylogenetics Evolution* 29: 613–628.
 - Philipson W.R. e Philipson M.N., 1986. A revision of *Rhododendron* III subgenera *Azaleastrum*, *Mumeazalea*, *Candidastrum* and *Therorhodion*. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 44: 1-23.
 - Planta Europa, 2008. A sustainable future for Europe; the European strategy for plant conservation 2008–2014. *Plantlife International* (Salisbury, UK) and the Council of Europe, Strasbourg
 - Pornon A., Escaravage N., Thomas P., Taberlet P., 2000. Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Molecular Ecology* 9, 1099-1111.
 - Pornon A., Escavarege N., Till-Bottraud I., Doche B., 1997. Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology* 130: 1-11.
 - Pornon A, Escaravage N., 1999. Genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) populations: origin and maintenance. *Plant Ecol* 141: 145-150.
 - Pornon A. and Doche B., 1994. Dynamics and Functioning of *Rhododendron ferrugineum* Sub-alpine Heathlands (Northern Alps, France). In Beniston M. (eds), *Mountain Environments in Changing Climates*, Routledge, London, pp. 244–258.
 - Potts B.M. e Reid J.B., 1985. Analysis of a hybrid swarm between *Eucalyptus risdonii* Hook. f. and *E. amygdalina* Labill. *Australian Journal of Plant Physiology* 33: 543-562.
 - Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
 - Rabinowitz D., 1981. Seven forms of rarity. Pages 205-217 in H. Synge, editor. *The biological aspects of rare plant conservation*. John Wiley & Sons, Chichester.
 - Rabinowitz D., Rapp J.K, Cairns S., and Mayer M., 1989. The persistence of rare prairie grasses in Missouri: environmental variation buffered by reproductive output of sparse species. *The American Naturalist* 136: 328-344.

-
- Rajora O.P., Mosseler A., Major J.E., 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior. *Canadian Journal of Botany*. 78:941-956.
 - Rieseberg L.H. e Carney S.E., 1998. Tansley review number 102. Plant hybridization. *New Phytologist* 140: 599-624.
 - Rieseberg L.H., 1997. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 359-389.
 - Rieseberg L.H., Raymond O., Rosenthal D.M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J.L., Schwarzbach A.E., Donovan L.A. e Lesxer C., 2003. Major ecological transitions in annual sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211-1216.
 - Scharfetter R, *Das Pflanzenleben der Ostalpen*, Fr. Denticke, Wien, 1938, 419 p.
 - Schemske D.W., 2000. Understanding the origin of species. *Evolution* 54: 1069-1073.
 - Schlötterer C., Tautz D., 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20(2): 211-215.
 - Schlüssel A., Theurillat J.P., Chambèsy, and Wiget L., Neuchâtel, 2000. The phenology of *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) in correlation to temperature, frost, insolation, and snow cover duration. *Phytocoenologia*, 30(3-4): 457-468.
 - Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J et al., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
 - Slagsvold T., 1981. Clutch size and population stability in birds: a test of hypotheses. *Oecologia* 49:213-217.
 - Sleumer H., 1949. Ein System der Gattung *Rhododendron* L. *Botanische Jahrbuch Systematic* 74: 511-553.
 - Sleumer, H., 1980. Past and present taxonomic systems of *Rhododendron* based on macromorphological characters. Pp. 19-26 in *Contribution toward a classification of Rhododendron* eds J.L. Luteyn e M.E. O'Brien. New York Botanical Garden.
 - Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, D.C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W.H., Hoot, S.B., Fay, M.F., Axtell, M., Swensen, S.M., Prince, L.M., Kress, W.J., Nixon, K.C., Farris, J.S., 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18s rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of Linneus. Society* 133: 381-461.

-
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nickrent, D.L., Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Sweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., Zimmer, E.A., Chaw, S.M., Gillespie, L.J., Kress, W.J., Sytsma, K.J., 1997. Angiosperm phylogeny inferred from 18s ribosomal DNA sequences. *Annales of Missouri Botanical Garden* 84: 1–49.
 - Stace C.A., 1987. Hybridization and the plant species. In: *Differential patterns in higher plants.* (ed. Urbanska K.M.) pp. 115-127. Academic Press. New York.
 - Stebbins G.L. e Daly K., 1961. Changes in the variation of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* 152: 1183-1202.
 - Stebbins G.L., 1959. The role of hybridization in evolution. *Proc. Am. Phil. Soc.* 103: 231-251.
 - Storchova H. e Olson M.S., 2007. The architecture of the chloroplast psbA-trnH non-coding region in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 268: 235-256.
 - Suh Y., Thien L.B., Reeve H.E., Zimmer E.A., 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American Journal of Botany* 80: 1042–1055.
 - Theurillat, J.P., Felber, F., Geissler, P., Gobat, J.-M., Fierz, M., Fischlin, A., Küpfer, P., Schlüssel, A., Velutti, C., and Zhao, G.-F.: 1998, ‘Sensitivity of Plant and Soils Ecosystems of the Alps to Climate Change’, in Cebon, P., Dahinden, U., Davies, H. C., Imboden, D., and Jaeger, C. C.(eds.), ‘Views from the Alps: Regional Perspectives on Climate Change’, MIT Press, Cambridge, MA, pp. 225–308.
 - Thompson J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.,1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
 - Thuiller W., 2007. Climate change and ecologist. *Nature* 448:550–552.
 - Thuiller W., Lavorel S., Araujo M.B., Sykes M. T. e Prentice I.C., 2005. Climate change threats to plant diversity in Europe. In: *PNAS* 102, 23: 8245-8250. The National Academy of the USA.
 - Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

-
- Vendramin G.G., Ziegenhagen B., 1997. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome* 40: 857–864.
 - Vezzulli A., Troglio M., Coppola G., Jermakow A., Cartwright D., Zharkikh A., Stefanini M., Grando M.S., Viola R., Adam-Blondon A.F., Thomas M., This P., Velasco R., 2008. A reference integrated map for cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) from three crosses, based on 283 SSR and 501 SNP-based markers. *Theoretical and Applied Genetics* 117(4): 499-511
 - Wagner W.H., 1969. The role and taxonomic treatment of hybrids. *Bioscience* 19: 785-789.
 - Wagner W.H., 1970. Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon* 19: 146-151.
 - Wang B.S.P., Charest P.J., Downie E., 1993. Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species. *FAO Forestry Paper*, n. 113 pp. 83.
 - Weir B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
 - Wolf P.G., Doche B., Gielly L., Taberlet P., 2004. Genetic Structure of *Rhododendron ferrugineum* at a Wide Range of Spatial Scales. *Journal of Heredity* 95: 301-308.
 - Wolff R.K., Plaetke R., Jeffreys A.J., White R., 1989. Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* 5(2): 382-384.
 - Wright S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 313-354.
 - Yakimowsky S.B., Eckert C.G., 2007. Threatened peripheral population in context: geographical variation in population frequency and size and sexual reproduction in a clonal woody shrub. *Conservation Biology* 21:811–822.
 - Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T., 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-Based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.
 - Zanella G., 1989. Il clima montano in Emilia Romagna. In Goidanich G, Gambi L, Ferrari C, Ricci Lucchi F, Adani G, editors. *Il mondo della natura in Emilia Romagna* 1: 141-164. Pizzi, Milano.

Allegati

Genetic variability of relict *Rhododendron ferrugineum* L. populations in the Northern Apennines with some inferences for a conservation strategy.

Ilaria Bruni¹, Fabrizio De Mattia², Massimo Labra^{2*}, Fabrizio Grassi³, Silvia Fluch⁴, Maria Berenyi⁴, Carlo Ferrari⁵

¹Research Centre on Environmental Sciences, Vegetation Ecology Laboratory, University of Bologna, Via S. Alberto 163, I- 48100 Ravenna, Italy

²Department of Bioscience and Biotechnology, University of Milano-Bicocca, P.zza della Scienza 2, I-20126 Milan, Italy

³Botanical Garden, Department of Biology, University of Milan, Via Celoria 26, I-20133 Milan, Italy

⁴Austrian Research Centers GmbH - ARC, Department Health & Environment, Bioresources/PICME, 2444 Seibersdorf, Austria

⁵Department of Experimental Evolutionary Biology, University of Bologna, Via Innerio 42, I-40126 Bologna, Italy

***CORRESPONDENCE TO:**

Massimo Labra

Ph. +390264483472

e-mail: massimo.labra@unimib.it

Abstract

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) is a subalpine shrub that can be found throughout the Pyrenees and the Alps. The Northern Apennines are one of the southernmost limits of its geographical range. Local populations are very few, small and scattered over three mountain groups of the chain. In this study, the genetic diversity of such three Apennine populations (AP1, AP2 and AP3) was analysed and compared to the one of three populations from the near Maritime Alps and of six populations from the Central-Eastern Alps. Genetic variations across microsatellite markers revealed that the Apennine populations show some clonal individuals and the lowest genetic diversity values (AP1 and AP3 A[18] values are 2.46 and 2.31, respectively), as well as heterozygosity deficiency with respect to the Alpine populations. Genetic relationships among populations (Nei's genetic distance) showed that, according to their geographical distribution, populations from the Central-Eastern Alps and from the Maritime Alps clustered in two separate groups, while the three Apennine populations were associated to either of the two main clusters. PCA analysis showed a clear separation of the three Apennine populations according to the high F_{st} values detected (AP1-AP2 = 0.427; AP1-AP3 = 0.446; AP2-AP3 = 0.325). Mantel test revealed a significant correlation between genetic and geographical distance matrices ($r = 0.314$, $P = 0.001$, 999 permutations).

Considering the geographical and ecological peripheral condition of these populations and the high impact of the climatic changes on their habitat, we suggest an *ex situ* conservation strategy by a germplasm bank to preserve the most of their genetic variability.

Key words

Apennines, Maritime Alps, microsatellites, nuclear SSR, pseudo-rarity, *Rhododendron ferrugineum* L.

Introduction

Rhododendron ferrugineum L. - the Alpenrose - is an acidophilous subalpine shrub, which is found in the Pyrenees and in the Alps as well as in the Northern Apennines. On this last mountain chain, where it attains one of the southernmost limits of its geographic range, *R. ferrugineum* is rare, with small populations. It is likely that since the late glacial age, up to about 2000 years BC, *R. ferrugineum* was relatively abundant above the Northern Apennines timberline, despite the heavy human interference (Lowe et al. 1994; Rossi & Orrico 1996).

At present, relict populations of *R. ferrugineum* can be found only on three mountain groups of the Northern Apennines: Mt. Libro Aperto, Mt. Prado-Vecchio, Mt. Nuda-Cima Belfiore (Ferrarini 1973; Alessandrini & Bonafede 1996), within open ericaceous dwarf shrublands on some north and north-western facing slopes (Ferrari & Piccoli 1997).

The Northern Apennine populations of *R. ferrugineum* offer an example of “pseudo-rarity” (Rabinowitz 1981) or “peripheral rarity” (Hengeveld & Haeck 1982; Brown 1984; Nathan et al. 1996), as they are small and scattered in few sites. They can be a relevant case study on the relative effects of reproductive isolation and genetic drift on the genetic structure of populations, which in *R. ferrugineum* could have been enhanced by its remarkable clonal propagation (Körner 2003). A review of extant literature failed to identify any data about the genetic features of these populations.

The Northern Apennine populations were analysed to estimate the level of genetic constitution and variability in comparison with the closest ones in the Maritime and Central-Eastern Alps. A better understanding of the genetic features of these populations will be crucial to evaluate their response to environmental changes and human pressures and to estimate their extinction risk. Such information could also provide a better understanding of the genetic relationships between Alpine and Apennine populations and will also be crucial to define plant sources suitable for local reintroduction and to plan the best conservation strategy.

Considering the low values of genetic variation detected in the *R. ferrugineum* populations from the Alps by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) studies (Pornon & Escaravage 1999; Wolf et al. 2004; Manel et al. 2007), our analysis focused on hyper variable DNA regions, such as Simple Sequence Repeats (SSRs) (Powell et al. 1996). A specific set of these markers, developed by Fluch et al. (in press), were used in our study.

Materials and methods

Plant material and DNA analysis

Twelve populations of *R. ferrugineum*, 181 individuals totally, were sampled. The sample size of each population ranged from nine to 20 individuals with a mean of 15.1 (Table 1). We collected leaves from individuals spaced at least 15 m apart, in order to avoid sampling related individuals. In the Northern Apennines (Fig. 1) *R. ferrugineum* grows only in three different sites (Mt. Libro Aperto, Mt. Prado - Vecchio, Mt. Nuda - Cima Belfiore). Only on Mt. Libro Aperto (AP1) a large population can be found on a north-western facing slope. On site AP2 (Mt. Prado - Vecchio), there is a small and fragmented population on its north-facing slope. On site AP3 (Mt. Nuda - Cima Belfiore), Alpenrose individuals are mainly clustered in few small groups in open *Vaccinium myrtillus* L. and *V. gaultherioides* L. dwarf shrublands, slightly above the upper wood limit. In each of the three Apennines sites we sampled the greatest number of present individuals.

Three populations from the Maritime Alps (AM1, AM2 and AM3 – close to the Italian/French boarder) and six from the Central-Eastern Alps (AL1, AL2, AL3, AL4, AL5 and AL6 – along the Austrian and Slovenian boarder) were sampled to be analysed and compared with the Apennine populations (Table 1).

Total genomic DNA was extracted and purified using the DNeasy™ Plant Mini Kit (Qiagen, Italy) according to the manufacturer's handbook. Quality and quantity of the isolated DNA were determined using the Qubit fluorimeter (Invitrogen Life Technologies, Milan, Italy).

A total of ten nuclear SSR loci were tested on a subset of *R. ferrugineum* samples. Seven of these primer combinations showed reproducible amplification products as well as variability in the test samples (Table 2). Genomic DNA of 181 individuals all, corresponding to the 12 populations, was analysed using the seven SSR loci (RodA, RodC, RodD, RodE, RodG, RodH and RodI; Table 2). Amplifications were performed with a PCR-bead Ready-to-go Kit (Amersham Bioscience, Italy) in a volume of 25 µl starting from 10 ng of DNA and 10 pmol of forward and reverse primers. Amplification reactions were multiplexed based on the annealing temperature (T_a) of the corresponding primer pairs: RodA was combined with Rod C at T_a 56 °C while RodD was combined with RodE, RodG and RodH at T_a 49 °C. In the multiplex PCRs, the forward or reverse primer of each combination was labelled with 6-FAM, NED, VIC and PET fluorescent dyes (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) respectively (Table 2). Rod I with a T_a of 65 °C was analysed in single amplifications.

The PCR thermal profile was: 3 min at 94 °C, 35 cycles of 50 sec at 94 °C, 50 sec at annealing temperature (T_a), 50 sec at 72 °C with a final extension step of 30 min at 72 °C. PCR products (1 µL) were mixed with 12 µL of formamide and 0.2 µL of LIZ-500 size standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) and then analysed on an ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A). The allele sizes for each nSSR locus were identified using Genemapper 4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A).

Data analysis

For each population and nSSR locus, genetic parameters, such as the observed average allele number (N_a), the percentage of polymorphic loci (P%), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and number of private alleles (PA), were calculated using the program FSTAT (Goudet 2001). The intra-population genetic diversity was also evaluated in terms of allelic richness (A) (El Mousadik & Petit 1996) using a fixed sample size of nine (18 gene copies). Fixation index (F_{IS}) was calculated for polymorphic loci both to test the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and to estimate the genetic differentiation among populations (Weir & Cockerham 1984). The significance of deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, as evidence by deviation of F_{IS} from zero, was tested by randomization using FSTAT software (Goudet 2001). All the calculations were performed using POPGENE version 3.2 (Yeh et al. 1999), and FSTAT (Goudet 2001).

We evaluated also the null alleles, using MICRO-CHECKER v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) software (confidence interval = 99% and number of randomisations = 1000), to test the significance of heterozygosity level.

The genetic relationships among populations were evaluated by generating a dendrogram based on the D_A genetic distances among them (Nei et al. 1983), using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA), applying the Populations 1.2.3Beta software (Langella 2007). The significance of each node in the dendrogram was evaluated by 1,000 bootstraps derived using the same software.

Population genetic structure was also evaluated by Bayesian clustering (Falush et al. 2003; Pritchard et al. 2000) using STRUCTURE 2.2 software (Pritchard et al. 2007), which assigns individuals into K subpopulations (clusters) based on an admixture model and a correlated allele frequencies model (Falush et al. 2003).

Genetic differentiation of the populations of *R. ferrugineum* was quantified using the differentiation index F_{ST} (Weir & Cockerham 1984). We also conducted an analysis of molecular variance (AMOVA) using ARLEQUIN v. 3.0 software (Excoffier 2005). Total genetic variation was partitioned into among regions, among-populations within-regions and within populations. Groups have been constructed on the basis of the three geographical regions: the Apennines (AP), the Maritime Alps (AM) and the Central-Eastern Alps (AP) (Table 3).

In order to assess the genetic relationships among the members of the three Apennine populations as individual plants, a Principle Component Analysis (PCA), based on multilocus genotypes using GENALEX ver. 6 (Peakall & Smouse 2006) (Fig. 3), was performed.

Patterns of isolation by distance (IBD), indicating spatial genetic structure (Wright 1943), were evaluated among the three Apennine populations according to Rousset (1997), using a Mantel test with 999 random permutations between the pairwise population differentiation comparisons for $F_{ST}/(1-F_{ST})$ and the natural logarithms of geographical distances. The values for IBD were tested using GENALEX ver. 6 software (Peakall & Smouse 2005).

Results

Genetic variability in the sampled populations of *R. ferrugineum*

All selected nSSR loci were polymorphic (Table 2), revealing a total of 82 alleles in 181 individuals from 12 populations. The number of alleles per locus across all the populations ranged from seven (locus RodC) to 20 (locus RodD), with an average of 11.7 different alleles per locus. High genetic diversity, as measured by Nei's index of expected heterozygosity (H_e), was found. The average H_e showed a restricted range, with values ranging from 0.60 (locus RodG) to 0.84 (locus RodD). A total of 23 private alleles were also detected (28%) in the analysed samples.

Before the calculation of genetic parameters, for the fact that this species can also be reproduced through ramets (Escaravage et al. 1998), we tested the presence of clones of each population. Only the three Apennine populations have showed some clonal individuals; AP1 population showed four groups of clonal individuals (three composed of two individuals and one composed of three individuals, nine clonal samples totally), while AP2 and AP3 populations showed a pair of clonal individuals. That samples were not used for the computation of inbreeding coefficients not to alter the results.

The values of the within-population genetic diversity parameters, allelic richness ($A_{[18]}$), expected and observed heterozygosity (H_e and H_o) and inbreeding coefficients (F_{is}), are presented in Table 1. The AP1 and AP3 Apennine populations showed the lowest values of allelic richness with $A_{[18]}$ values of 2.46 and 2.31, respectively, while the populations from the Maritime Alps showed highest $A_{[18]}$ values.

The mean value of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity in the analysed samples was 0.36 and 0.50 respectively. Heterozygosity deficiency was detected in all the analysed populations; however AP1, AP2 and AP3 showed the lowest H_o values (0.21, 0.13 and 0.23 respectively).

In accordance with the detected heterozygosity deficiency, highest values of F_{is} coefficients were found in AP1 (0.46) and AP2 (0.72) populations. This excess of homozygotes may derive from the presence of null alleles in some nSSR loci. The Micro-checker software detected possible null alleles in locus RodD (AP1 and AP2 populations) and locus RodH (only AP1 population). Based on these results, the genetic parameters reported in Table I were recalculated excluding the null alleles, however, no substantial changes were observed due to the low frequency of null alleles. Because the frequencies of null alleles do not appear to be significant, higher F_{IS} values could be due to a real condition of homozygosity (data not shown).

Genetic relationships among populations

The clustering of these 12 populations, based on Nei's genetic distance (Nei et al. 1983), is shown in Fig. 2A. According to their geographical distribution, populations from the Central-Eastern Alps and the three populations from the Maritime Alps clustered in two separate groups, while the three Apennine populations were associated to either of the two main clusters. The AP1 population was graphically placed close to the populations from the Maritime Alps, while the other two Apennine populations showed a clear genetic separation from the alpine populations.

To better investigate the relationships among the sampled populations, we also used a clustering approach at the individual level. We analyzed the nSSR genotype data with Structure (Pritchard et al. 2000). In this study, we used runs involving 10,000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) iterations after a burn-in period of 10,000 iterations without prior information on the populations of origin of the sampled individuals. The optimal value of K was estimated by calculating ΔK to identify the top level in the hierarchical structure, according to Evanno et al. (2005). For this study the optimal K value were resulted to be $K = 2$ and then $K = 5$ (graph not shown). Structure analysis with $K = 2$ (Fig. 2B) showed similar result of Nei's genetic distance of Fig. 2A while $K = 5$ showed a separation of two Apennine populations. Individual of AP1 and AP3 clusters in a separated groups (AP1 - $Q = 0.98$; AP3 - $Q = 0.94$). Samples of AP2 clusters almost ($Q = 0.69$) in the same group of AL5, AL6 and some individuals of AP4 (Fig. 2B).

The total amount of genetic variation of the analysed populations was partitioned by AMOVA into components, which well matched with geographical regions as well as among populations within regions. The results showed that the within populations variation accounted for the 60.48% of the total variance; while the 20.73% is the result of differences among populations within groups, versus the 18.79% among groups ($P \leq 0.001$) (Table 3). These data suggested

significant population differentiations in *R. ferrugineum* at region level and population/regions level.

Genetic features of the Northern Apennine populations

The relationships among Apennine populations were investigated by PCA analysis. The results were shown in Fig. 3. The first two main components in PCA explain the 46.95% and the 24.64% of the variation respectively. PCA analysis showed a clear separation of the three Apennine populations. These results concord with the high F_{st} values registered among these populations (AP1-AP2 = 0.427; AP1-AP3 = 0.446; AP2-AP3 = 0.325). Mantel test revealed a significant correlation between genetic and geographical distance matrices ($r = 0.314$, $P = 0.001$, 999 permutations), indicating the role of the geographical isolation in shaping the present population genetic structure of *R. ferrugineum* in the Apennines.

Discussion

The SSR analysis on *R. ferrugineum* suggests that among Apennine populations, the clonal propagation and inbreeding induced a low genetic variability and, consequently, a genetic drift. As described by Escaravage et al. (1998) and Pornon et al. (2000), this species tends to adopt a clonal phalanx growth, even if – according to our data – it is not possible to clarify the balance between sexual and asexual reproduction. Our analyses reveal that the Alpine populations showed consistent intrapopulation genetic variability and heterozygosity. One previous work (Wolf et al. 2004) showed that *R. ferrugineum* usually adopts clonal propagation within a small spatial scale, but the genetic diversity in a population is maintained by sexual reproduction and seed diffusion. In small-sized populations, characterized by individuals with few buds and flowers, outcrossing is clearly reduced, whereas both self-pollination and clonal phalanx growth strategy increase. In the Northern Apennine small populations, our molecular results seem to confirm the prevailing self-pollination

and clonal propagation, with very low heterozygosity values in the three analysed populations all. In addition, the spatial isolation of the three populations from one another prevents gene flow among different sites and increases the development of the population showing different alleles frequencies and private alleles (Table 2).

At an early colonizing stage, it is very likely that the Apennine populations were established by seedling recruitments (Pornon & Escaravage 1999), while present populations are relicts of wider clones. As they are small and isolated from one another, they are highly vulnerable. The question of how important the small and peripheral populations are for the gene diversity conservation is linked to the genetic relationship between these populations and the ones which correspond to the species distribution core. Putatively the Apennine populations of *R. ferrugineum* derive from a Pleistocene expansion of this species from the near Maritime Alps (Ferrarini 1973). Our samples are few and geographically restricted to confirm such an origin: more populations at the southern edge of the Alps need to be taken into account for a better inference, and cp/mtDNA markers would be more informative for such a test. Notwithstanding, it is significant that the only large Apennine population (AP1), which lie on the Mt. Libro Aperto, has a genetic constitution close to the one of the populations from the Maritime Alps.

The small Northern Apennine populations of *R. ferrugineum* are the result of rarity of favourable sites, where the snow cover attains a duration and a depth sufficient for the protection of buds from frost (Ferrari & Piccoli 1997; Körner 2003). Strong winds, (above 4 ms⁻¹) to which the Northern Apennine slopes are particularly exposed (Zanella 1989), have a negative effect on growth of *R. ferrugineum* (Tranquillini 1979). This can be inferred from the morphological traits characterizing the three Apennine populations: small plant size, presence of few buds per plant, and a prostrate growth form. These features, combined with our molecular data, suggest that the

vulnerability of the Apennine populations is chiefly related to the local rarity of suitable habitats, and therefore to the genetic effects of their ecological insularity.

These morphological traits have a local adaptive value and preserved the Apennine Alpenroses up until today. In the near future, it is likely that climatic changes will induce a further decline of the *R. ferrugineum* habitats on the Northern Apennines - though their present inclusion in protected areas - with an increasing extinction risk of the local populations. A shorter duration and a lower depth of snow cover could support more dense *Vaccinium gaultherioides* and *Vaccinium myrtillus* populations, significantly reducing favourable sites for *R. ferrugineum* (Bianco & Boulard 1974).

That's is the reason why the *in situ* conservation strategy is doubtful. The genetic constitution of these peripheral populations, with its private alleles, suggests that the first aim of a conservation strategy is to preserve as much genetic variability as possible. The *in situ* conservation is not a suitable strategy because the *R. ferrugineum* species is clearly sensible to the climatic changes underway (i.e. snow cover reduction). The most reasonable long-term strategy would be an *ex situ* conservation by a germplasm bank, using the well-known Millennium Seed Bank Project (MSBP) (see e.g. Linington 2000; Guerrant et al. 2004), to preserve the most numbers of genotypes in the three populations and by excluding clonal plants.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Francesco Salamini for perceptive comments that improved this manuscript. We also thank Marcello Corazza (Bologna), Germano Federici (Bergamo), Luigi Minuto (Genova), Pierluigi Nimis (Trieste), Augusto Pirola (Pavia), Antonio Portanova (Modena), Giovanni Zecca (Milano), and Adriana Tondato for their valuable help in collecting samples; Lorenzo Ceccarelli of the Italian Corps of Forest Rangers (Pistoia Office, Abetone station) for

sampling facilities and Giovanna Colombo for the language revision.

The research was partly funded by the University of Bologna (RFO 2007; resp. C. Ferrari) and *Regione Lombardia* (INGENIO and DOTE RICERCATORI grants).

References

- Alessandrini A, Bonafede F. 1996. Atlante della Flora protetta della Regione Emilia-Romagna, Regione Emilia-Romagna, Bologna.
- Bianco J, Bulard C. 1974. Etude de la germination des graines de *Rhododendron ferrugineum* L. et de *Tofieldia calyculata* L. Wahlenb. Travaux Scientifiques Parc Naturel de la Vanoise V, 121-130.
- Brown JH. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *Am Nat* 124: 255-279.
- El Mousadik A, Petit RJ. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *TAG Theor Appl Genet* 92: 832–839.
- Escaravage N, Questiau S, Pornon A, Doche B, Taberlet P. 1998. Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Mol Ecol* 7: 975–982.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1687.

-
- Ferrari C, Piccoli F. 1997. The ericaceous dwarf shrublands above the Northern Apennine timberline (Italy). *Phytocoenologia* 27: 53-76.
- Ferrarini E. 1973. *Rhododendron ferrugineum* L. in fitocenosi relitte dell'Appennino settentrionale. *Giornale Botanico Italiano* 107: 143-156.
- Fluch S, Berenyi M, Hristoforoglu K, Kopecky D, Burg K. (in press) Development of a microsatellite marker system for the Alpine species *Rhododendron ferrugineum* and *Rhododendron hirsutum*.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guerrant EO, Havens K, Maunder M. 2004. *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Covelo, U.S.A.
- Hengeveld R, Haeck J. 1982. The distribution of abundance. I. Measurements. *Journal of Biogeography* 9: 303-316.
- Körner C. 2003. *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountains ecosystems*. 2nd edn. Springer, Berlin-Heidelberg
- Langella O. 2007. Populations 1.2.30: population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). France. <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Linnington S. 2000. The Millenium Seed Bank Project. In: Rushton BS, Hackney P and Tyrie CR, (eds) *Biological Collections and Biodiversity*. Linnean Society of London Special Publication 3.
- Lowe JJ, Davite C, Moreno D, Maggi R. 1994. Holocene pollen stratigraphy and human interference in the woodlands of the northern Apennines, Italy. *Holocene* 4: 153-164.

-
- Manel S, Berthoud F, Bellemain M, Gaudeul M, Luikart G, Swenson JE, Waits LP, Taberlet P. Intra-biodiv Consortium, 2007. A new individual-based spatial approach for identifying genetic discontinuities in natural populations. *Mol Ecol* 16: 2031-2043.
- Nathan R, Shmida A, Fragman O. 1996. Peripherality and regional rarity are positively correlated: quantitative evidence from the upper Galilea Flora (North Israel). In: Steinberger Y (ed) *Preservation of Our World in the Wake of Change*. Jerusalem, Israel, Vol. VI A/B ISEEQS Pub: 561-564
- Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol* 19: 153-170.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pornon A, Escaravage N. 1999. Genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) populations: origin and maintenance. *Plant Ecol* 141: 145-150.
- Pornon A, Escaravage N, Thomas P, Taberlet P. 2000. Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Mol Ecol* 9: 1099-1111.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingley S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pritchard JK, Wen W, Falush D. 2007. STRUCTURE ver. 2.2. University of Chicago, Chicago, <http://pritch.bsd.uchicago.edu/>
- Rabinowitz D. 1981. Seven forms of rarity. In Syngé H (ed.) *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*, 205-217. John Wiley & Sons Ltd., New York.

-
- Rossi G, Orrico D. 1996. Pedo-anthracological studies on the evolution of the upper treeline in the Tuscan-Emilian Apennines: preliminary data. *Archivio Geobotanico* 2: 173-174.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 219–1228.
- Tranquillini W. 1979. *Physiological Ecology of the Alpine Timberline. Tree Existence at High Altitudes with Special Reference to the European Alps.* (Ecological Studies, 31). New York and Berlin: Springer Verlag.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535-538.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wolf PG, Doche B, Gielly L, Taberlet, P. 2004. Genetic Structure of *Rhododendron ferrugineum* at a Wide Range of Spatial Scales. *J Hered* 95: 301-308.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-Based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.
- Zanella G. 1989. Il clima montano in Emilia Romagna. In Goidanich G, Gambi L, Ferrari C, Ricci Lucchi F, Adani G, editors. *Il mondo della natura in Emilia Romagna* 1: 141- 164. Pizzi, Milano.

Figure captions

Fig. 1 - Sample sites of *R. ferrugineum* L. in Italy. The satellite image shows – from North to South – the Central Eastern Alps, the Maritime Alps, and the Northern Apennines. Abbreviations and geographical information on each population are listed in Table 1.

Fig. 2 - 2A: Classification dendrogram (UPGMA) based on polymorphisms of 7 SSR loci in the 12 *R. ferrugineum* L. populations, using Nei's unbiased genetic distance coefficients. Population codes as in Table 1.

2B: Barplot showing genetic diversity structure for *R. ferrugineum* accessions using the program STRUCTURE (v.2.2). Each sample is represented by a vertical bar fragmented into K sections (K= 2 and K = 5) of specific length according to their membership proportion in both genetic clusters inferred by STRUCTURE. Population codes as in Table 1.

Fig. 3 - Scattergram of the three Northern Apennine populations of *R. ferrugineum*. The ordination method is PCA. Coord. 1= 46.95% Coord. 2= 24.64%.

◆AP1 (Mt. Libro Aperto) ■AP2 (Mt. Prado – Vecchio) ▲AP3 (Mt. Nuda – Cima Belfiore).

Table 1. Geographical information on the sampling populations collected from Apennines (AP), Maritime Alps (AM) and Central-Eastern Alps (AL) and the statistical genetics computed basing on polymorphisms of the 7 SSR loci. Clonal individuals observed in the AP1, AP2 and AP3 populations were not considered to calculate the following genetic parameters. Na, average number of alleles; A, allelic richness; P, percentage of polymorphic loci; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity (standard deviations in brackets); Fis, coefficient of inbreeding and PA, private allele. A is based on minimum sample size of 9 diploid individuals (18 gene copies).

Site	Geographical name	Latitude (N)	Longitude (E)	Elevation (m)	Nr. of samples	Na	A _[18]	P(%)	Ho	He	Fis	PA
AP1	Mt. Libro Aperto	44°11'	10°43'	2100	21	2.71	2.46	71.43	0.21	0.37	0.46*	3
AP2	Mt. Prado-Vecchio	44°13'	10°27'	1906	10	3.14	3.14	85.71	0.13	0.41	0.72*	2
AP3	Mt. Nuda-Belfiore	44°17'	10°14'	1793	19	2.86	2.31	100.00	0.23	0.31	0.29*	2
AM1	Mt. Saccarello	44°03'	7°43'	2100	9	4.86	4.86	85.71	0.44	0.61	0.29	3
AM2	Mt. Grai-Val Nervia	43°59'	7°40'	1800	11	5.57	5.33	100.00	0.35	0.68	0.50*	4
AM3	Colle delle Finestre	44°07'	7°21'	2125	12	4.86	4.51	100.00	0.40	0.66	0.40*	3
AL1	Col Merende-Casera Razzo	46°28'	12°36'	1805	16	3.43	3.17	100.00	0.48	0.51	0.06	1
AL2	Campitello di Fassa	46°28'	11°44'	1860	14	3.14	3.66	100.00	0.45	0.52	0.14	1
AL3	Passo Rolle	46°10'	11°50'	1950	10	4.14	3.07	85.71	0.47	0.48	-0.01	0
AL4	Mt. Padrio	46°10'	10°13'	1858	20	3.86	3.21	100.00	0.38	0.46	0.18	1
AL5	Gromo	45°57'	09°55'	1730	20	4.00	3.10	100.00	0.39	0.48	0.19	0
AL6	Paglio	46° 03'	09°21'	1795	19	4.00	3.05	100.00	0.37	0.48	0.24	3
Mean						3.88	3.50	94.05	0.36	0.50	0.41	1.92

* Significant deviation of Fis value from zero tested with 1,000 randomizations ($P < 0.05$)

Table 2 Details of SSR loci using to investigate the genetic characters of the analyzed population and values of the genetic diversity for each locus.

Na, average number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity.

SSR loci	Original name	AccNr	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Dye	Size (bp)	Na	Ho	He
RodA	Rho_ARC_238	FJ823251	CCTGTGCTACAGTTGG	GCAGGTTACCAGTAAAAC	6-FAM (F)	64-84	8	0.61	0.72
RodC	Rho_ARC_230	FJ823249	GATTGGAAGTGACAAGTC	CCCGTTTAGTATGGATG	NED (R)	291-310	7	0.22	0.73
RodD	Rho_ARC_201	FJ823239	ACTTAAAAGAATGCCTCTC	CCCGTTTAGTATGGATG	6-FAM (R)	127-181	20	0.30	0.84
RodE	Rho_ARC_218	FJ823243	TTCTTCTGATTTTCGTTGC	TTTCTTAGGACCGATGATT	NED (R)	82-145	10	0.21	0.71
RodG	Rho_ARC_190	FJ823238	GGACCGATGATTACTTCT	GGACCGATGATTACTTCT	VIC (F)	102-140	11	0.28	0.60
RodH	Rho_ARC_013	FJ823230	GACAAAATAGCTCCTCTAA	GTTCTATTAATGGGGATT	PET (F)	165-188	15	0.47	0.67
RodI	Rho_ARC_185	FJ823236	GCACAAGGGAGGTATCAAG	GTGGCTCCTGAGACATTC	VIC (R)	207-234	11	0.42	0.82

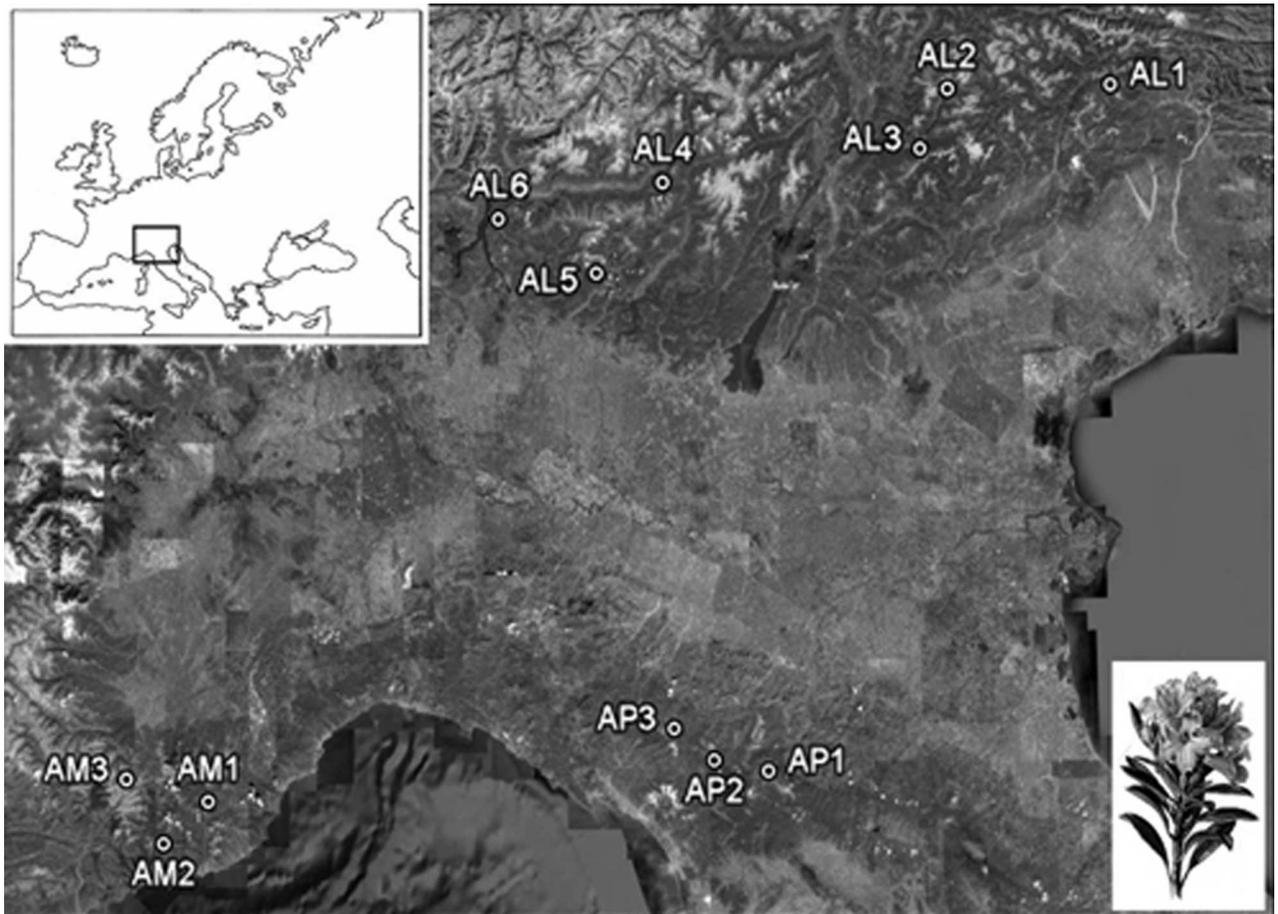
Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 181 individuals grouped in 12 populations from three geographical regions.

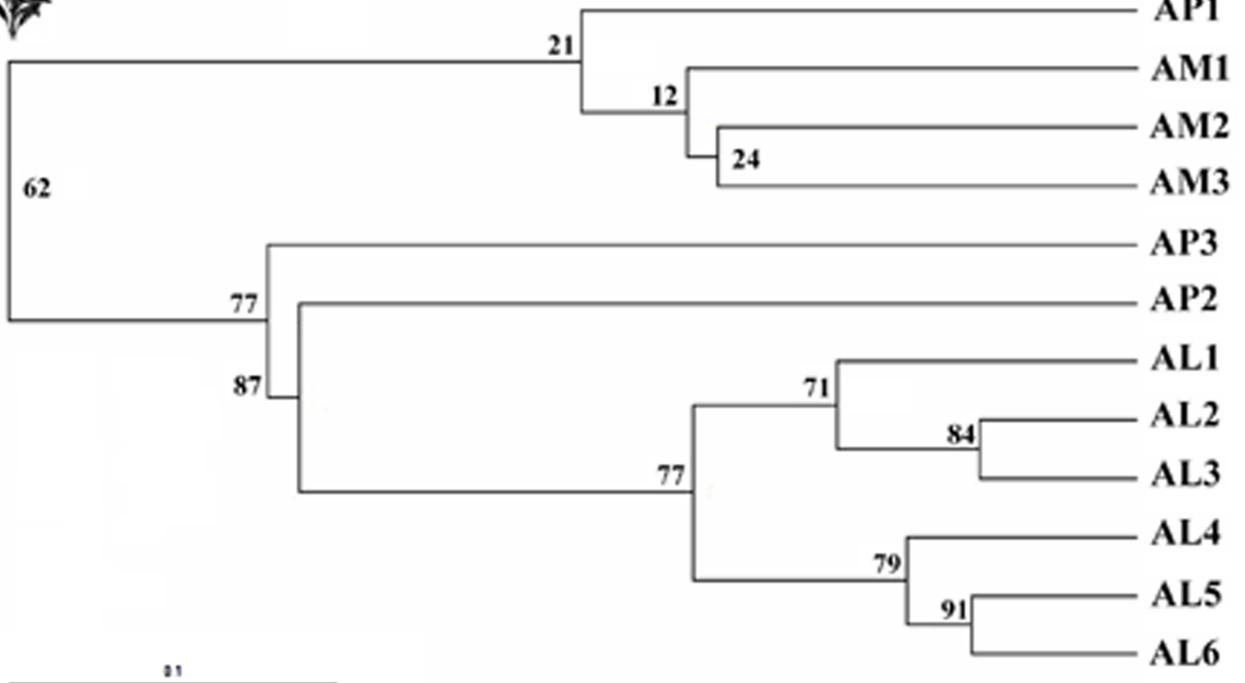
Source of variation	df	Variance components ^a	Total variance (%)	P-value ^b
Among region	2	0.52911	18.78	<0.001
Among populations within regions	9	0.58412	20.73	<0.001
Within population	336	1.70398	60.48	<0.001

df Degrees of freedom

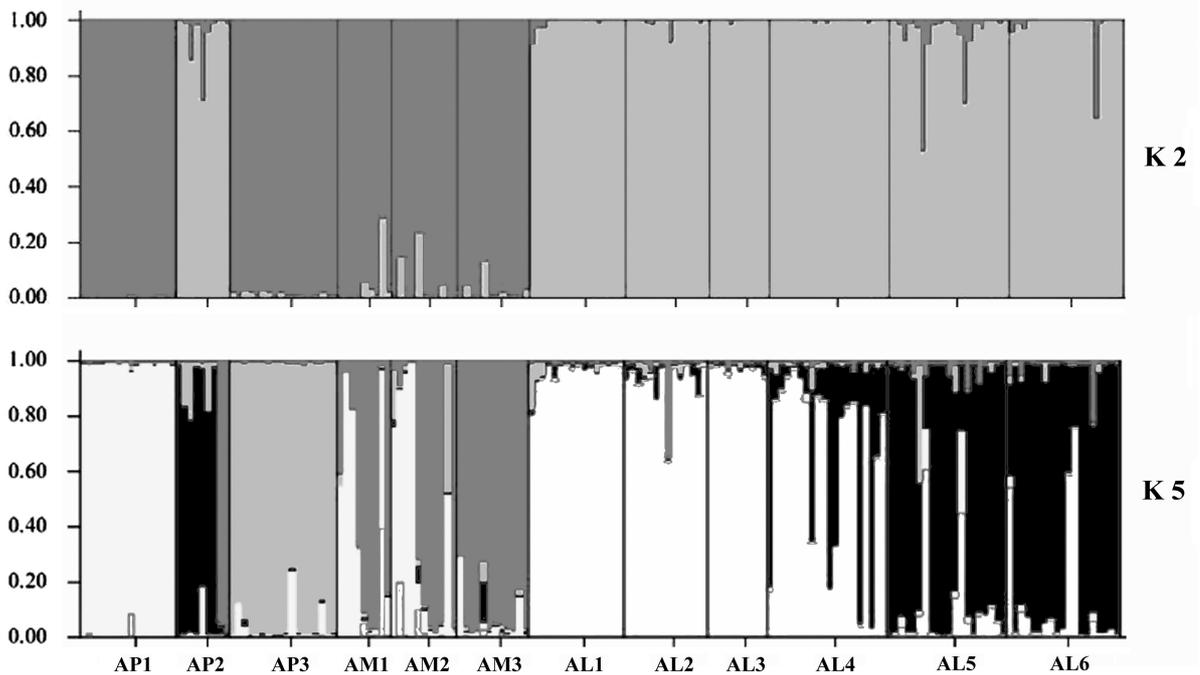
^aTotal variation contributed by each component (%)

^bSignificance (n = 1023 permutations)

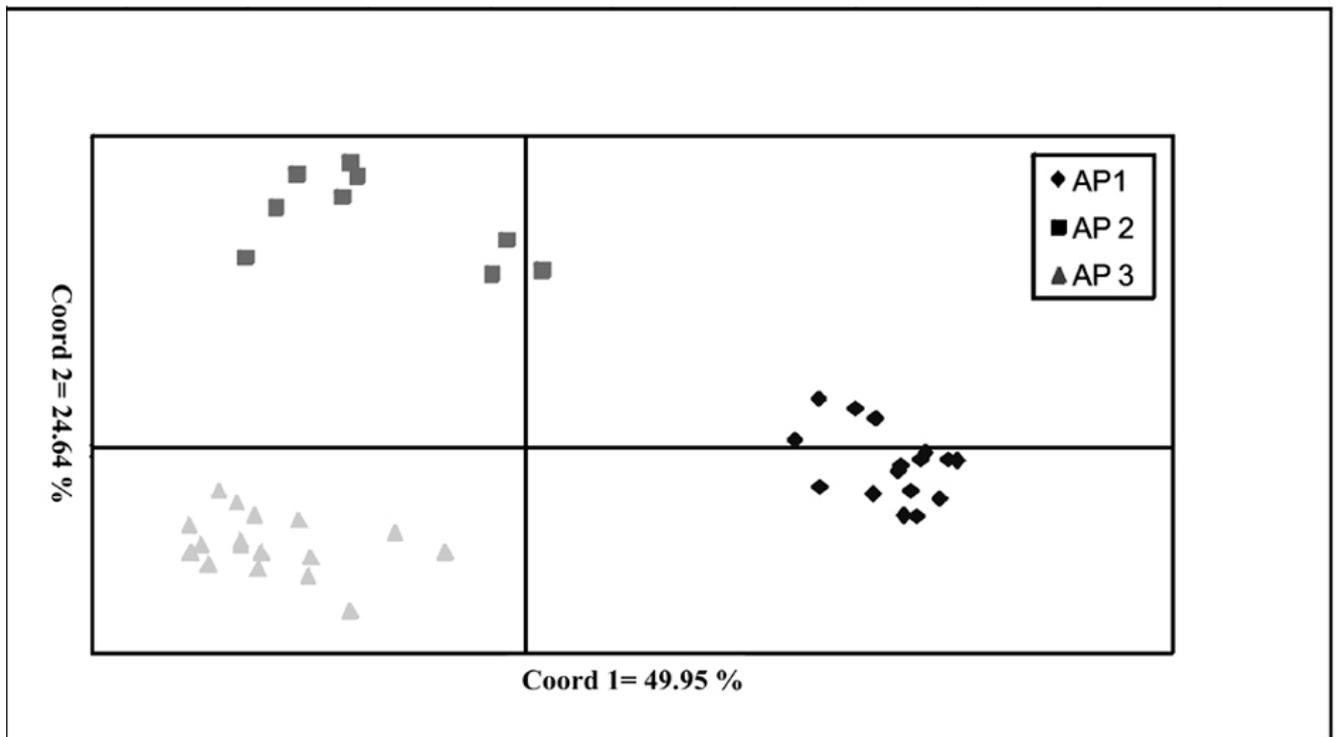




A



B



Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione e il sostegno:

Professor Carlo Ferrari e Dottoressa Giovanna Pezzi dell'Università di Bologna.

Dottor Massimo Labra, Dottor Fabrizio De Mattia e lo ZooPlantLab dell'Università di Milano-Bicocca.

Dottoressa Silvia Fluch dell'Università di Innsbruck.

Dottor Fabrizio Grassi e Dottor Giovanni Zecca dell'Università di Milano.

Per i campionamenti:

Professor Federici, Professor Nimis, Professor Pirola, Dottor Avino, Dottor Corazza, Dottoressa Dei Cas, Dottoressa Escaravage, Dottor Gòmez, Dottoressa Losa, Dottor Portanova e Dottor Zecca.