



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA AVANZATA**

XXVIII CICLO

**STUDIO DELLA VARIABILITA' E DELLA CONNETTIVITA' GENETICA IN
POPOLAZIONI RELITTE DI *Platanus orientalis***

Coordinatore del corso

Ch.^{mo} Prof. Luciano Gaudio

Tutor

Ch.^{mo} Prof. Salvatore Cozzolino

Candidata

Dott.^{ssa} Rosita Rinaldi



ABSTRACT

Genetic diversity and connectivity in relict populations of *Platanus orientalis*.

Mediterranean ecosystem, due to its complex paleoclimatic history, hosts important residual of past vegetation that survives with a scattered natural range by occupying restricted ecological niches. Massive changes in vegetation have occurred recurrently during the succession of glacial and interglacial periods in Europe. Several members of the Tertiary tree flora disappeared from the European continent during Quaternary glaciations, with the exception of few relict species that survived in refuge areas in southern and south-eastern Mediterranean. For these relict species information about the distribution of genetic diversity and populations genetic structure is fundamental for determining in situ and ex situ conservation strategies. In particular, these relict species, often distributed in small and scattered populations are expected to display very low levels of diversity due to the effect of genetic drift and to the restricted inter-populations gene flow. For these species the genetic characterization of individuals, if coupled with information from their spatial distribution, age and pattern of relationship among individuals, can allow a fine-scale genetic spatial structure of the relict populations. This is of special interest because the spatial arrangement of related individuals within populations provides also insights into pollen and seed dispersal patterns. Finally, because pollination is often between near neighbours, an understanding of fine-scale genetic structure may allow predictions concerning the likelihood of selfing or biparental inbreeding. Among relict tree species, *Platanus orientalis* L. is an Euro-Asiatic floristic element of warm riparian forests and southern Italy represents the westernmost limit of its distribution. Here we compared levels of genetic diversity and connectivity within and among populations of *P. orientalis* selected from the peripheral and central part of its distribution. For this aim we used microsatellites markers in order to: (1) measure genetic diversity at different levels (individual, population, species); (2) analyse gene flow within and among populations; (3) perform paternity and parentage analysis to evaluate the contribution of seed and pollen dispersion to population connectivity. The analysis was conducted considering seven microsatellites loci for a total of 429 individuals from 17 populations distributed in South Italy, Greece, Albania, Turkey and Bulgaria selected as representative of peripheral and central distribution. The total number of detected alleles was 38. Populations from central distribution always show polymorphism in all examined loci while most of loci were often found fixed in the peripheral Italian populations. These latter were also the ones with the lowest values of observed and expected heterozygosity (the lowest value, $H_o=0.15541$ and $H_e=0.29551$, found in the Campanian population). The genetic differentiation between populations, estimated as proportion of total diversity, was calculated through the coefficient of F_{st} . F_{st} values were higher among the Italian populations (average $F_{st}=0.3547$) than among populations from the central distribution (average $F_{st}=0.1213$) indicating a greater isolation and then an higher differentiation among the Italian populations. These results were also supported by AMOVA analysis that showed most of the observed genetic variation occurring within population (63%) and not among



populations (37%). According to this analysis, the small population size and the low genetic connectivity detected among Italian populations support a scenario where genetic drift plays a major role in shaping the diversity of *P. orientalis* populations at the peripheral of its range. Paternity analyses on seeds experimentally tested the effective seed and pollen dispersion within and among isolated populations. Plastid DNA sequencing supported a scenario of two main phylogeographic lineages as also outlined by population genetic analyses with Sicilian populations connected to east Mediterranean populations and Italian peninsular population connected to a continental Greek lineages. The genetic bottleneck and the low connectivity among the peripheral populations could potentially determine extinction of these residual populations.

INDICE

INTRODUZIONE	5
BIODIVERSITA' E HOTSPOT NELL'AREA MEDITERRANEA	5
STORIA GEOLOGICA DELL'AREA DEL MEDITERRANEO	12
STORIA PALEOCLIMATICA DEL MEDITERRANEO	15
STORIA DELLA VEGETAZIONE NEL MEDITERRANEO.....	21
TAXA ATTUALMETE A DISTRIBUZIONE RELITTA	30
BIOGEOGRAFIA STORICA DELLA FAMIGLIA DELLE PLATANACEAE	37
IL GENERE PLATANUS	41
MITI E LEGGENDE LEGATE AL PLATANO.....	47
PRINCIPALI FATTORI CHE INFLUENZANO LA DIVERSITA' GENETICA DELLE POPOLAZIONI RELITTE DI <i>Platanus orientalis</i> E SCOPO DELLA TESI	60
MATERIALI E METODI	71
ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA MATERIALE FRESCO E CAMPIONI D'ERBARIO	71
ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO	73
AMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI MICROSATELLITARI.....	74
ELETTROFORESI CAPILLARE SU MICROSATELLITI	77
ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI: ASSEGNAZIONE ALLELICA E DETRMINAZIONE DEL GENOTIPO.....	79
ANALISI STATISTICHE SU DATI MICROSATELLITARI	81
LIBRARY MICROSATELLITARE	84
ESPERIMENTI DI GERMINAZIONE.....	88
ANALISI DI PATERNITA'	91
AMPLIFICAZIONE DEI MARCATORI PLASTIDIALI VIA PCR.....	92
REAZIONI ED ANALISI DI SEQUENZA	95
ESTRAZIONE DEL DNA PLASTIDIALE	95
NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).....	97
RISULTATI E DISCUSSIONE	98
AREE DI CAMPIONAMENTO	98
ANALISI DELLA VARIAZIONE ALLELICA MICROSATELLITARE.....	99
ANALISI DEL DNA PLASTIDIALE	125
CONCLUSIONI	134
BIBLIOGRAFIA	137

INTRODUZIONE

BIODIVERSITA' E HOTSPOT NELL'AREA MEDITERRANEA

Il termine biodiversità è un neologismo entrato nell'uso quotidiano circa una decina di anni fa. E' stato coniato nel 1986 da Walter G. Rosen come contrazione di "biological diversity"; il termine biodiversità indica la quantità di specie animali e vegetali viventi in un dato territorio. In realtà, ne troviamo traccia già nei primi documenti dell'Accademia dei Lincei (inizio del sec. XVII) dove è menzionata la "diversitas plantarum". Attualmente il termine biodiversità si riferisce all'insieme di strutture e funzioni diversificate che i sistemi viventi hanno sviluppato, sotto il vaglio della selezione naturale, in base all'efficienza nell'uso delle risorse materiali ed energetiche. La biodiversità può, anche, essere definita utilizzando le parole di Edward O. Wilson come "la varietà degli organismi a tutti i livelli, da quello delle varianti genetiche appartenenti alla stessa specie fino alla gamma delle varie specie, dei generi, delle famiglie e ai livelli tassonomici più alti; comprende anche la varietà degli ecosistemi, ossia la varietà delle comunità degli organismi presenti in un particolare habitat, e delle condizioni fisiche in presenza delle quali essi vivono" (Wilson, 1999). Dalla definizione di Wilson appare evidente che la biodiversità include numerosi livelli di organizzazione biologica, da quello genetico a quello delle comunità vegetali e animali che compongono gli ambienti terrestri e acquatici (Pignatti, 2005). La diversificazione delle specie, degli ecosistemi e più in generale degli ambienti naturali attualmente presenti sulla Terra, è il risultato di quasi quattro miliardi di anni di evoluzione biologica, durante i quali la vita si è adattata alla componente non vivente del pianeta, raggiungendo gli attuali livelli di complessità. Tutelare la biodiversità è, dunque, fondamentale al fine di preservare l' esistenza degli ecosistemi e assicurare i servizi, derivanti dagli stessi, di cui l'uomo fruisce. Secondo stime prudenti, le specie viventi sul nostro pianeta

potrebbero essere circa 10 milioni. Al Mondo sono conosciute più di 380.000 specie vegetali, di cui circa un quarto è a rischio di estinzione. Le principali minacce alla loro conservazione sono la distruzione degli habitat naturali ed il cambiamento climatico.

Nel 1988 l'ecologista inglese Norman Myers cercò di affrontare il problema partendo dalla teoria che la biodiversità potesse essere tutelata, con un notevole risparmio rispetto ad altre strategie, attraverso la conservazione di aree relativamente circoscritte del pianeta, i cosiddetti "biodiversity hotspots" (punti caldi di biodiversità). Norman Myers ha introdotto il concetto nel 1988 e nel 1990 in due articoli. Per essere qualificata come un hotspot della biodiversità una regione deve avere due criteri: deve contenere almeno lo 0.5% o 1.500 specie endemiche e deve aver perso almeno il 70% della sua vegetazione primaria. Un hotspot di biodiversità è una regione geografica con una significativa riserva di biodiversità che è a rischio a causa dell'uomo. Nel mondo 34 aree sono classificate come hotspot. Le strategie di conservazione rappresentano una questione cruciale nel bioma mediterraneo perchè quest'area, che rappresenta solamente il 2% della superficie mondiale, ospita il 20% della ricchezza floristica mondiale. Myers inizialmente definì nel mondo 25 hotspots (Fig.1), di cui 4 in biomi con clima mediterraneo (Sudovest Australia, Regione del Capo-Sud Africa, California e parte del Cile). L'organizzazione Conservation International (C.I.), impegnata nella salvaguardia della biodiversità, adottò sin dal 1989 questa teoria; recentemente la C.I. ha aumentato il numero degli hotspots da 25 a 34, a seguito di una rivisitazione condotta da circa 400 specialisti e durata quattro anni. Complessivamente questi hotspots rappresentano solo il 2.3% della superficie terrestre, ma si stima che il 50% di tutte le piante vascolari ed il 42% dei vertebrati terrestri, conosciuti ad oggi, siano esclusivi di queste zone. Il 38% della superficie degli hotspots cade in aree protette (Parchi e riserve), mentre il 68% si trova in zone prive di qualsiasi protezione (Myers N. et al. 2000).

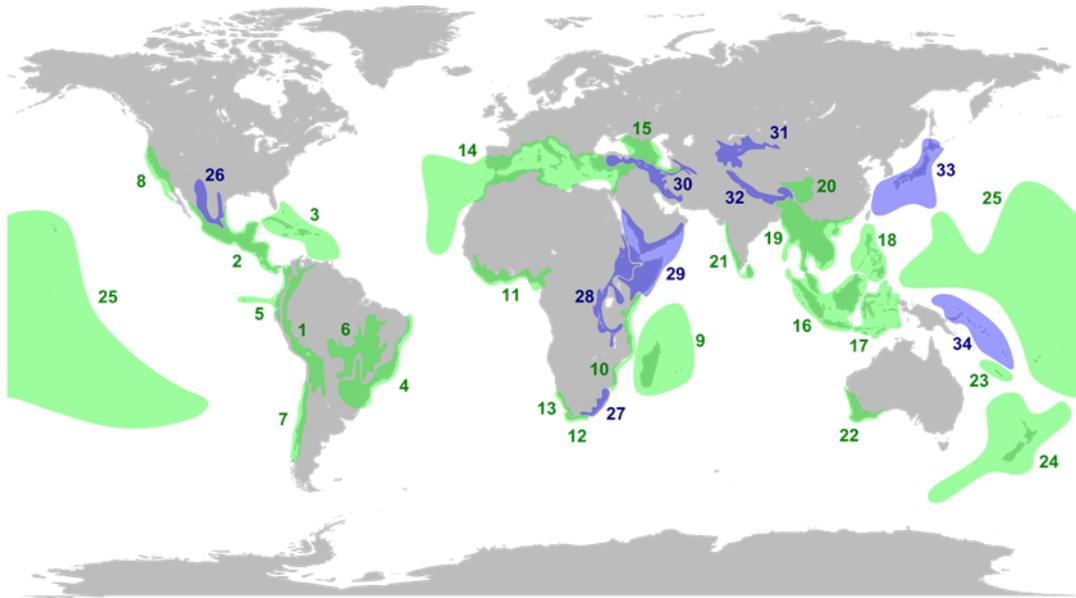


Figura 1 | 25 hotspots (verde) di biodiversità come indicati in Myers, N., et al. (2000) 1. The Tropical Andes 2. Mesoamerica 3. The Caribbean Islands 4. The Atlantic Forest 5. Tumbes-Chocó-Magdalena 6. The Cerrado 7. Chilean Winter Rainfall-Valdivian Forests 8. The California Floristic Province 9. Madagascar and the Indian Ocean Islands 10. The Coastal Forests of Eastern Africa 11. The Guinean Forests of West Africa 12. The Cape Floristic Region 13. The Succulent Karoo 14. The Mediterranean Basin 15. The Caucasus 16. Sundaland 17. Wallacea 18. The Philippines 19. Indo-Burma 20. The Mountains of Southwest China 21. Western Ghats and Sri Lanka 22. Southwest Australia 23. New Caledonia 24. New Zealand 25. Polynesia and Micronesia An additional nine hotspots (blue) have since been added [1]: 26. The Madrean Pine-Oak Woodlands 27. Maputaland-Pondoland-Albany 28. The Eastern Afromontane 29. The Horn of Africa 30. The Irano-Anatolian 31. The Mountains of Central Asia 32. Eastern Himalaya 33. Japan 34. East Melanesian Islands.

Come le altre 4 aree "mediterranee" il Bacino del Mediterraneo è uno dei maggiori centri della diversità vegetale nel mondo. Il ruolo prominente giocato da quest'area è stato enfatizzato dallo stesso Myers, ma egli esitò nell'individuare l'intero bacino come un unico hotspot perchè esso copre un' estesa superficie e per certe regioni era disponibile un insufficiente quantitativo di informazioni. In questo contesto Medail and Quezel nel 1997 riportano un quadro globale della ricchezza in piante e degli endemismi per definire in maniera più precisa gli hotspots nel bacino del Mediterraneo; essi identificarono 10 hotspots per poi, due anni più tardi (1999), ritornare sull'argomento con una discussione organica che descrisse i vari approcci possibili per definire le priorità di conservazione nel bacino mediterraneo. Nel 2000 Myers aggiunge il Bacino del Mediterraneo agli hotspots di biodiversità del pianeta.

In conclusione l'hotspot del Bacino del Mediterraneo è caratterizzato da un nucleo centrale e da 10 mini-hotspots (Fig.2), che pur rappresentando solo circa il 22% dell'area totale del Bacino, ospitano qualcosa come 5.500 specie di piante endemiche, ovvero il 44% di quelle presenti

complessivamente nel Mediterraneo, e risultano perciò essere “i punti più caldi del Mediterraneo”.



Figura 2 L’hotspot del Bacino del Mediterraneo si estende dal Portogallo alla Giordania e dalle Isole Canarie all’Italia del Nord; esso comprende Cipro, più del 90% della Grecia, del Libano e del Portogallo, ma meno del 10% della Francia, dell’Algeria e della Libia. Degli originali 2,085,292 km² ne rimangono solo 98,009 da “salvare”. (Cartina © 2005 Conservation International).

Dei 10 mini-hotspots esistono due principali centri di biodiversità: uno ad ovest, comprendente la Penisola Iberica e il Marocco e uno ad est, comprendente parte della Turchia e della Grecia. La particolare natura delle Isole Canarie e Madeira (percentuale di endemismi rispettivamente di 38% e 26%), insieme alla loro elevata unicità tassonomica, deve porre l'interesse su queste isole che stanno sperimentando negli ultimi anni una decisa regressione degli habitats. In passato la maggior parte di questo hotspot era coperto da foreste sempreverdi di querce, conifere, e da foreste decidue. L’uomo ne ha modificato pesantemente il profilo ed oggi il tipo di vegetazione più diffuso è la macchia (matorral o maquis), costituita da dense formazioni arbustive di specie a foglia coriacea (sclerofille) che comprende rappresentanti dei generi *Juniperus*, *Myrtus*, *Olea*, *Phillyrea*, *Pistacia* e *Quercus*. Alcuni componenti importanti della vegetazione mediterranea (specie dei generi *Arbutus*, *Calluna*, *Ceratonia*, *Chamaerops* e *Laurus*) sono in realtà relitti dalle antiche foreste che coprivano il Bacino due milioni di anni fa. I frequenti incendi hanno portato all’affermarsi di specie come la quercia spinosa (*Quercus coccifera*), il cisto (*Cistus* spp.) o il *Sarcopoterium spinosum*, che rigenerano velocemente dopo il

passaggio del fuoco. La regione mediterranea costituisce contemporaneamente sia un' area rifugio sia un' area in cui sono favoriti gli scambi vegetazionali e la speciazione attiva. Nei bacini occidentali, le aree con molti endemismi sono collegate all'età della piattaforma geologica, qui prevalgono gli endemismi relitti, mentre ad oriente sono più frequenti gli endemismi per vicarianza, grazie al ruolo moderato delle glaciazioni e alla presenza di rocce ultrafemiche. In relazione ai suddetti eventi geologici e alle successive vicende storiche, come l'apertura del Canale di Suez, nonché ai suddetti fattori idrografici, le specie mediterranee possono essere incluse in differenti categorie biogeografiche in cui predominano: le specie di origine atlantica (temperate, boreali e sub-tropicali), introdotte attraverso Gibilterra; le specie endemiche (che vivono esclusivamente nel Mediterraneo), sia paleoendemiche (relitti della Tetide) sia neoendemiche (di origine Pliocenica); nonché le specie introdotte attraverso il Canale di Suez (specie Lessepsiane) e quelle cosmopolite (Bianchi e Morri, 2000). Attualmente il numero di specie macroscopiche, vegetali e animali, è stimato intorno a 12.000 (Boudouresque, 2004). Sebbene il bacino mediterraneo rappresenti una minima frazione degli oceani del globo (soltanto lo 0,82% in superficie e lo 0,32% in volume), tale dimensione della diversità biologica costituisce circa il 7% della biodiversità marina del pianeta, considerando le specie macroscopiche vegetali e animali. Anche il numero di specie endemiche del Mediterraneo, risultato della sua particolare paleogeografia, è piuttosto alto (intorno al 25% dell'intero biota mediterraneo), sebbene la percentuale si riduca con la profondità per gli eventi geologici prima riportati e non manchino eccezioni, per cui la percentuale di endemismi può anche essere molto alta (49%) nel caso dei crostacei anfipodi (Emig e Geistdoerfer, 2004). L'aspetto più caratteristico dell'ambiente mediterraneo è la sua grande variabilità e ricchezza paesaggistica. L'originalità del paesaggio del bacino mediterraneo deriva dai molteplici fattori che hanno contribuito alla sua formazione: la complessità geomorfologica e geologica, la peculiarità storica

e climatica, i ripetuti fenomeni di separazione e congiungimento delle masse continentali durante il Terziario, e l'importanza di alcuni episodi avvenuti durante le ultime ere geologiche (Pliocene e Pleistocene), specialmente le glaciazioni del Quaternario. La regione mediterranea è considerata giustamente come uno dei posti più ricchi del mondo per quanto concerne la biodiversità. Tutti gli studi biologici sull'area mediterranea, benché non tutti i gruppi di organismi siano completamente conosciuti, sottolineano il numero elevato di specie endemiche viventi al suo interno, numero che può raggiungere, e spesso superare, il 40% in alcuni gruppi di organismi come nel caso delle piante. Si pensa che le ragioni di questa grande diversità e dell'alto tasso di endemismo siano:

- la sua posizione geografica tra l'area boreale euro-asiatica e quella tropicale/subtropicale africana che facilita la presenza di specie originarie di quasi tutti i conosciuti reami biogeografici: Siberia, sud Africa, e anche qualche relitto del continente antartico nel caso di alcuni componenti della fauna del suolo;
- la storia geologica e climatica che ha determinato il susseguirsi e la sovrapposizione di differenti episodi di colonizzazione da parte delle specie;
- la sua geomorfologia complessa (molte montagne e isole) e conseguentemente la varietà del suo clima e dei suoli, che risultano in una vasta varietà di habitat e biotopi. Anche se è ancora abbastanza difficile quantificare questa diversità, a causa delle difficoltà delle indagini sulla flora e fauna locali, differenti studi dimostrano che nella regione mediterranea si trovano numerosi hot spot (ossia un'area con una concentrazione eccezionale di biodiversità e un'alta densità di specie endemiche) molto importanti per la biodiversità dell'intero continente.

Nel panorama europeo l'Italia è caratterizzata da un patrimonio di specie tra i più significativi sia per il numero totale, sia per l'alto tasso di endemismo. La storia geologica, biogeografica e dell'uso del territorio, nonché la posizione centrale nel Bacino del Mediterraneo (uno dei 33

hotspot di biodiversità a livello mondiale) hanno determinato le condizioni per lo sviluppo dell'attuale ricchezza in biodiversità. Rispetto al totale di specie presenti in Europa, in Italia si contano oltre il 30% di specie animali e quasi il 50% di quelle vegetali, il tutto su una superficie di circa 1/30 di quella del continente. Più in dettaglio: la fauna è stimata in oltre 58.000 specie, di cui circa 55.000 di Invertebrati (95%), 1812 di Protozoi (3%) e 1265 di Vertebrati (2%), con un'incidenza complessiva di specie endemiche pari a circa il 30%. La flora è costituita da oltre 6.700 specie di piante vascolari (di cui il 15% endemiche), 851 di Muschi e 279 Epatiche. Per quanto riguarda i Funghi, sono conosciute circa 20.000 specie di Macromiceti e Mixomiceti (funghi visibili a occhio nudo). A fronte del gran numero di specie in pericolo di estinzione i fondi destinati alla tutela della biodiversità sono insufficienti, risulta cruciale allora, definire delle priorità di conservazione. Per meglio percepire e comprendere la biodiversità di questa vasta regione bisogna analizzare e comprendere la biodiversità del Mediterraneo nello spazio e nel tempo e ciò richiede una revisione di come e quando si sono sviluppate le sue principali caratteristiche fisiche nei tempi geologici; per fare ciò bisogna analizzare alcuni dei principali eventi accaduti nel Terziario, da un punto di vista geologico e climatico ed inoltre non bisogna sottovalutare l'impatto antropico avvenuto nell'Olocene; infatti l'attuale distribuzione delle specie vegetali presenti nel bacino del Mediterraneo, nonché l'elevato numero di endemismi, è frutto principalmente di importanti dinamiche climatiche e geologiche. Lo sviluppo e l'affermazione delle cenosi del Mediterraneo non possono essere descritte senza tener conto dei cambiamenti climatici dell'ultimo Miocene e del Pliocene. Ma non si può ignorare la più antica storia di cambiamenti geologici, che attraverso fratture e spostamenti di placche continentali ha prodotto le basi per la distribuzione attuale delle specie vegetali.

STORIA GEOLOGICA DELL'AREA DEL MEDITERRANEO

La regione mediterranea è l'unico caso di un grande mare circondato da tre continenti. Circa 250 milioni di anni fa, alla fine del Paleozoico tutte le masse terrestri del mondo erano riunite in un supercontinente, che è stato chiamato Pangea dal geologo tedesco e meteorologo Alfred Wegener. All'inizio del Giurassico, circa 200 milioni di anni fa, Pangea ha cominciato a rompersi in due supercontinenti più piccoli, Laurasia a nord e Gondwana a sud. Questi si sono separati durante tutto il Triassico (250-200 Ma) da un singolo oceano cuneiforme, chiamato Tetide o Palaeotetide. Questo antico oceano è stato trasformato nei primi anni del Mesozoico (250-65 Ma), a causa del movimento verso nord di Gondwana e della sua collisione con l'Eurasia. Come Pangea e Tetide gradualmente si sono divise in diverse unità più piccole, la geografia fisica della futura area mediterranea è stata trasformata attraverso convergenze continentali, collisioni, e altri spostamenti di placche tettoniche. Durante la metà del Giurassico (165 Ma) e l'inizio del Cretaceo (120 Ma), l'espansione del fondo marino ha creato l'Oceano Atlantico, tra l'Africa e il Nord America, e la Tetide -(ancestrale Mar Mediterraneo)- tra Africa ed Eurasia. Quando l'Eurasia ha iniziato ad allontanarsi dal Nord America alla fine del Cretaceo (80 milioni di anni fa) e l'inizio del Terziario, l'Africa si sposta verso est, ampliando l'Oceano Atlantico, e si avvicina all'Europa, innescando l'orogenesi alpina. Un secondo periodo di rafting e collisione si è verificato durante il Pliocene e Pleistocene (5-12 Ma), con l'aggiunta di un innalzamento e frattura delle Alpi. L'interazione fra la placca africana ed euroasiatica ha portato non solo all'innalzamento delle Alpi, ma anche ad un progressivo restringimento della Tetide (Hsü, 1971; Rosenbaum et al., 2002b). Infine, la Tetide si chiude definitivamente, durante il Cenozoico, un'era che ha avuto inizio circa 65 milioni di anni fa, quando vari frammenti di Gondwana, tra cui l'India e la penisola araba, collidono con il resto dell'Eurasia. Gli ultimi resti dell'antica Tetide sono l'odierno Mar Mediterraneo e i più piccoli, Mar Nero, Mar Caspio e il lago di Aral

(Rosenbaum et al., 2002a; Thompson, 2005). Sin dall'inizio del Terziario, la storia del Mediterraneo è stata complicata dall'isolamento e dai movimenti individuali di molte microplacche, le più importanti delle quali sono: la penisola Iberica e l'Apulia (che comprendono l'Italia, i Balcani e la Grecia), e la microplacca Cirno-Sarda (Biju-Duval et al., 1976; Rosenbaum et al., 2002; Papazachos e Papazachou, 2003). La microplacca Iberica ha giocato un ruolo pilota nell'evoluzione delle regioni, per la sua posizione, compresa tra le placche africana ed euroasiatica. Nel tardo Oligocene (28 Ma) il movimento verso sud-est dell'Africa rispetto all'Europa ha causato la rotazione di queste microplacche, con l'inclusione sia di grandi isole dell'ovest del mediterraneo sia di molti blocchi cristallini che sono stati successivamente collegati sia all' Africa che all'Europa. L'Apulia, invece, era una crosta continentale che collegava le masse continentali di Africa ed Eurasia, che separava i bacini occidentali da quelli orientali del Mar Mediterraneo; ed infine, le dinamiche relative della microplacca Cirno-sarda dall' inizio dell'Oligocene (35-30 Ma), quando ha cominciato a ruotare verso sud-est, ha aperto il bacino delle Baleari. La figura 3 descrive i momenti salienti delle transizioni geologiche. Queste storie hanno avuto importanti conseguenze su endemismo e differenziamento sia delle piante che degli animali. L'incontro tra la placca africana ed eurasiatica ha avuto due conseguenze principali sulla formazione dei paesaggi terrestri e marini mediterranei. In primo luogo, il Mediterraneo è ormai costituito da una serie di bacini più o meno individuali. In secondo luogo, come risultato della collisione tra la placca africana ed eurasiatica, vi è un anello di montagne intorno al bacino del Mediterraneo, fatta eccezione per il quadrante sud-orientale, tra la Tunisia e l'Egitto. I Romani hanno chiamato questo mare *mediterraneus*, che significa 'al centro della terra'. Gli Arabi e i Turchi lo hanno chiamato *mar Rumelian* (che vuol dire, Romano-Bizantino) (Matvejevic', 1999). Comunque, probabilmente, il modo più appropriato di chiamare il mar Mediterraneo potrebbe essere 'il mare tra le montagne'! (Blondel et al. 2010).

Successivamente tra gli 8 e i 6 Ma, sul versante più occidentale del bacino del Mediterraneo si verificarono processi di subduzione che, associati all'abbassamento medio delle temperature globali, produssero la chiusura della connessione con l'Oceano Atlantico, innescando la cosiddetta Crisi di Salinità del Messiniano (Hsü et al., 1977; Krijgsman, 1999). Durante questo periodo, alla fine del Miocene (5.96-5.33 Ma), l'intero bacino del Mediterraneo si disseccò progressivamente poiché, con l'innalzamento della soglia di Gibilterra con conseguente perdita del contributo delle acque atlantiche, il suo regime idrico divenne negativo; questo avviene proprio mentre il Mediterraneo si trova in una situazione climatica analoga a quella del Sahara attuale. Quindi interrotta la comunicazione con l'oceano Atlantico, l'evaporazione provoca il prosciugamento di gran parte del Mediterraneo, mentre la portata dei fiumi che sfociano in questo mare, per l'aridità del clima, è ridotta a livelli minimi.

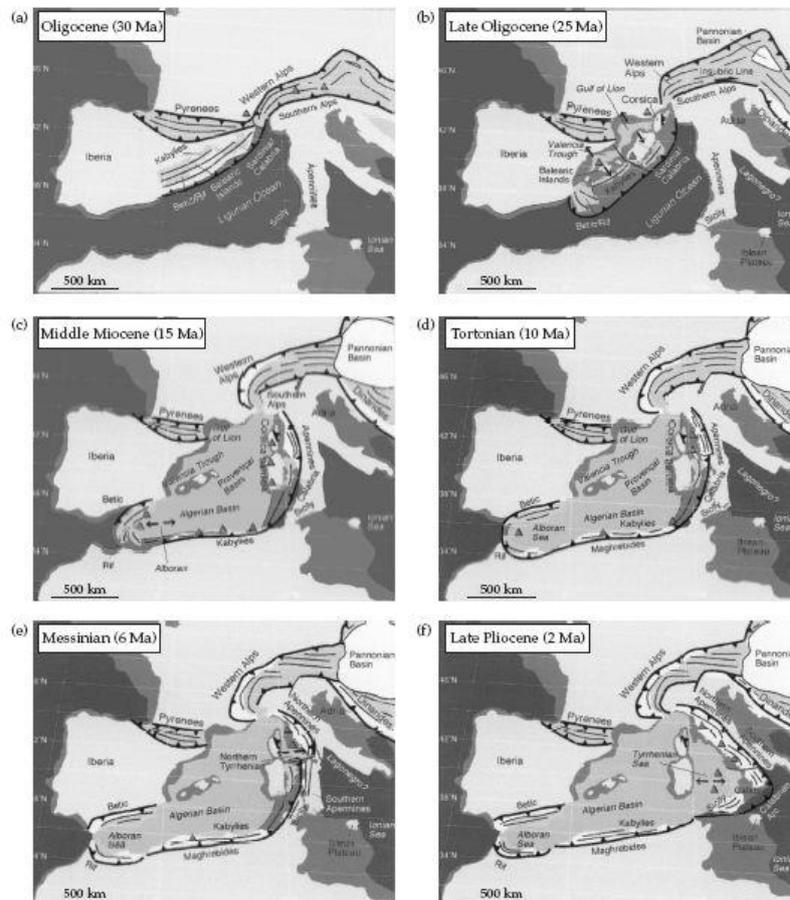


Figura 3 Movimenti delle microplacche tettoniche nella genesi del bacino del Mediterraneo occidentale negli ultimi 30 milioni di anni (come in Thompson, 2005).

Il Mediterraneo quindi costituisce una grande depressione desertica, con pochi corsi d'acqua a carattere torrentizio e sul fondo una serie di laghi salati (condizioni simili attualmente si hanno nel Mar Caspio o nel Mar Morto). Sebbene questo evento abbia avuto effetti drammatici di ridefinizione della distribuzione di acqua e terre emerse, esistono poche prove che dimostrino un suo ruolo determinante sul cambiamento del clima (Suc, 1984; Fauquette et al., 1998). Ciononostante l'ampia disponibilità di terre emerse che si produsse influenzò non poco la distribuzione delle specie vegetali ed animali in tutta l'area. La storia della separazione dei territori del Mediterraneo comincia quindi dal Miocene (ca. 25 Ma), con ovvi effetti sulla dispersione e l'eterogeneità delle specie ospitate.

STORIA PALEOCLIMATICA DEL MEDITERRANEO

La varia distribuzione dei territori continentali ed insulari, determinata dalla storia geologica del Mediterraneo, ha offerto lo scenario su cui hanno agito vigorose dinamiche climatiche, e queste a sua volta hanno rappresentato il fattore originario più importante per la definizione di condizioni ambientali ed habitat nuovi.

Durante il Miocene superiore (ca. 23–15 Ma), quando cominciarono i complessi movimenti delle microplacche del bacino, il clima dell'area mediterranea era fondamentalmente di tipo subtropicale, caratterizzato quindi da temperature mediamente superiori ai 15°C, e da precipitazioni intense nel periodo estivo, senza sostanziali alternanze stagionali di periodi caldi e freddi. Da questo momento in poi, tutta la regione andò incontro ad una lunga fase di modificazione climatica che ridusse progressivamente i regimi idrici e le temperature, con effetti di vario genere in aree diverse del bacino. Tra i 9 e gli 8 milioni di anni fa, per l'intero bacino del Mediterraneo si produsse un progressivo fenomeno di inaridimento (Ivanov et al., 2002; Fortelius et al., 2006; Van Dam, 2006), innescato probabilmente dallo spostamento verso

nord della Zona di Alta Pressione Subtropicale (Van Dam, 2006) e dalla chiusura del bacino sul suo versante orientale. In questa tendenza globale, l'influenza delle masse di aria umida provenienti dalle regioni atlantiche occidentali incrementò un gradiente di umidità decrescente verso est, che era comparso già attorno agli 11 Ma fa. In seguito, l'instaurarsi di un altro gradiente di umidità decrescente, stavolta da nord verso sud (ca. 7 - 5 Ma; Fortelius et al., 2006), determinò una tendenza di inaridimento crescente da nord-ovest a sud-est, che creò la base della modificazione delle cenosi mediterranee del Pliocene, e che è visibile ancora oggi nelle regioni mediterranee mediorientali drasticamente più aride e calde di quelle nordoccidentali. Tra i 6 e i 5 Ma fa, la crisi di salinità del Mediterraneo rappresentò il momento di svolta, almeno da un punto di vista cronologico, per l'instaurarsi dei parametri climatici che caratterizzano ancora oggi l'ambiente mediterraneo e che si aggiunsero agli effetti prodotti da un altro fattore importante di variabilità climatica, durato dalla fine del Miocene per tutto il Pliocene superiore (un periodo di ca. 4 Ma): l'abbassamento progressivo delle temperature medie (Fauquette et al., 1998; Van Dam, 2006) che ha un suo ruolo importante nella modificazione delle cenosi vegetali che seguì.

A cavallo tra tardo Pliocene e Pleistocene superiore (ca. 3.5 – 1.8 Ma), raffreddamento ed inaridimento del clima produssero infatti l'estinzione di numerose specie di organismi in molte regioni. In qualche caso, interi generi, a volte rappresentanti unici di particolari famiglie, sparirono completamente da talune aree del Mediterraneo, a vantaggio di specie più settentrionali adatte alle nuove condizioni climatiche. Questo fenomeno rispecchiò l'andamento e la direzione dei gradienti climatici, con estinzioni precoci a ovest e più tardive a est del bacino (Thompson, 2005). L'aridità, con l'abbassamento delle temperature, costituisce quindi il fattore chiave nella ridefinizione della composizione floristica mediterranea, che subisce in questo periodo un incremento marcato dei tassi di estinzione. Le condizioni

climatiche stabilizzarono progressivamente quei caratteri che oggi riconosciamo come tipici del clima mediterraneo: una stagionalità marcata, fatta di estati torride e inverni temperati che si è affermata stabilmente intorno ai 3 Ma fa (Suc, 1984; Thompson, 2005).

Nelle epoche successive, dal Pliocene inferiore (ca. 2.5-2.1 Ma) in poi, le condizioni geoclimatiche del bacino del Mediterraneo non hanno registrato inversioni di tendenza, ma all'inaridimento e al raffreddamento dell'area si aggiunsero i cicli di ere glaciali e interglaciali che caratterizzano ancora oggi il Quaternario (da 2.4 Ma; Bertoldi et al., 1989; Combourieu-Nebout, 1993; Thompson, 2005). Durante il Pleistocene, a causa di cambiamenti millenari dell'orbita terrestre (Hays et al., 1976), si manifestò una prolungata serie di fluttuazioni climatiche che interessarono tutto il Quaternario (Fig. 4).

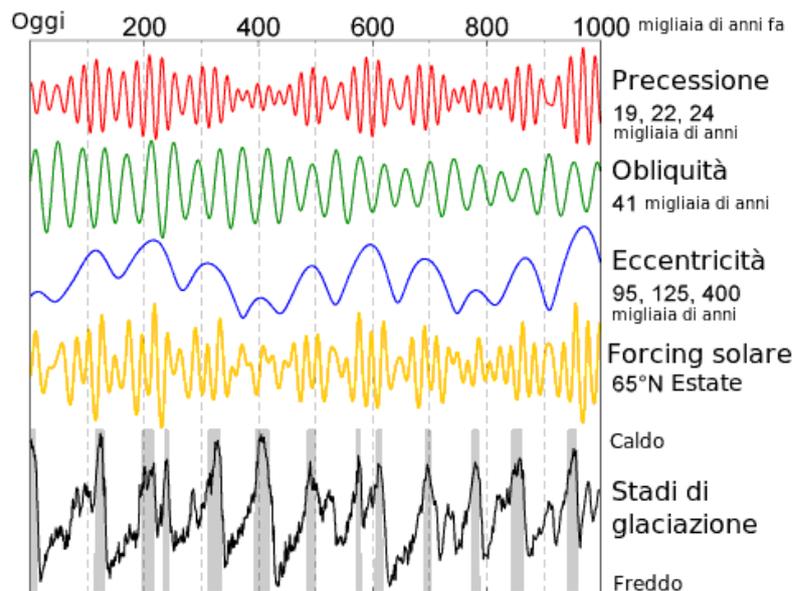


Figura 4 Oscillazioni climatiche di Milankovitch prodotte da variazioni cicliche dell'orbita terrestre.

I dati, prodotti da analisi paleo-climatiche effettuate nelle ultime decadi, hanno dimostrato come le alternanze tra glaciazioni e fasi interglaciali del Quaternario siano divenute particolarmente drastiche a partire da circa 700.000 anni fa. Fasi glaciali fredde ed aride, mediamente di durata pari a circa 100.000 anni, si sono alternati a periodi più brevi (circa 10-20.000 anni) caratterizzati da clima più caldo ed umido, le cosiddette fasi interglaciali

(Shackleton et al., 1973; Webb & Bartlein, 1992). Le oscillazioni periodiche espresse dai mutamenti climatici ciclici sono riconducibili a variazioni millenarie dell'inclinazione dell'asse terrestre (ca. 41.000 anni), dell'eccentricità dell'orbita (ca. 100.000 anni) e della distanza media annuale Sole-Terra (ca. 21.000 anni; Berger et al., 1988). Questi fenomeni astronomici sono noti come oscillazioni climatiche di Milankovitch (Fig. 5), dal nome dell'autore dell'opera seminale in materia (Milankovitch, 1941) che descrisse negli anni venti le variazioni periodiche dell'orbita e dell'inclinazione dell'asse della Terra rispetto al piano dell'orbita. Egli osservò che ogni 100.000 anni circa l'orbita ellittica di rivoluzione della Terra intorno al sole (eclittica), si allunga e si accorcia e che ogni 40.000 anni, varia l'inclinazione dell'asse di rotazione della terra su sé stessa rispetto all'eclittica ed infine che ogni 26.000 anni si verifica un'oscillazione dell'asse terrestre, detta precessione, che descrive un moto conico simile a quello di una trottola. Tutte queste variazioni nei parametri dell'orbita terrestre fanno variare la distribuzione e l'intensità della luce e dell'energia solare e di conseguenza il clima.

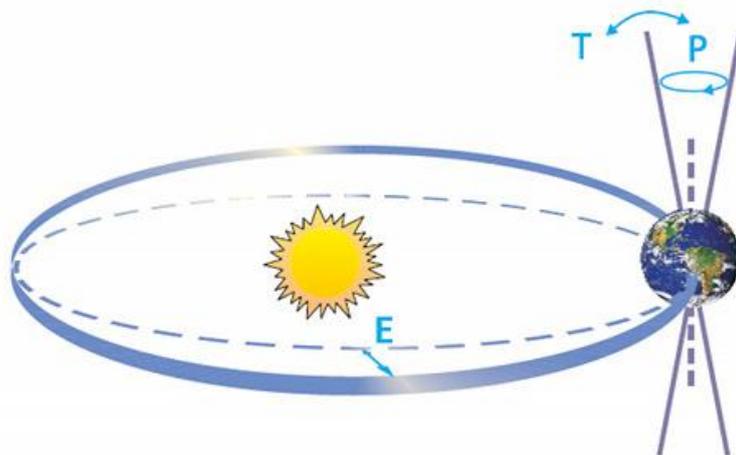


Figura 5 Cicli di Milankovitch. Schema di cambiamenti dell'orbita terrestre (Cicli di Milankovitch) che guidano i cicli di glaciazione. La "T" denota cambiamenti nell'inclinazione (o obliquità) dell'asse terrestre, "E" denota cambiamenti nell'eccentricità dell'orbita (a causa di variazioni nell'asse minore dell'ellisse) e "P" indica la precessione, cioè cambiamenti nella direzione dell'inclinazione dell'asse in un dato punto dell'orbita. Fonte: Rahmstorf e Schellnhuber (2006).

Gli strati di roccia sedimentaria negli oceani e nei mari confermano tale ipotesi, in quanto concordano sia con i cicli di Milankovitch, sia con i periodi freddi associati all'espansione planetaria dei ghiacciai che avvengono circa ogni 10.000 anni (Fig. 6), sono considerate la forza determinante nei pattern di differenziazione tra specie, poiché influenzano le dimensioni degli areali, l'affermazione di specie poliploidi, come anche il grado di specializzazione e la capacità di dispersione degli organismi (Thompson, 2005).

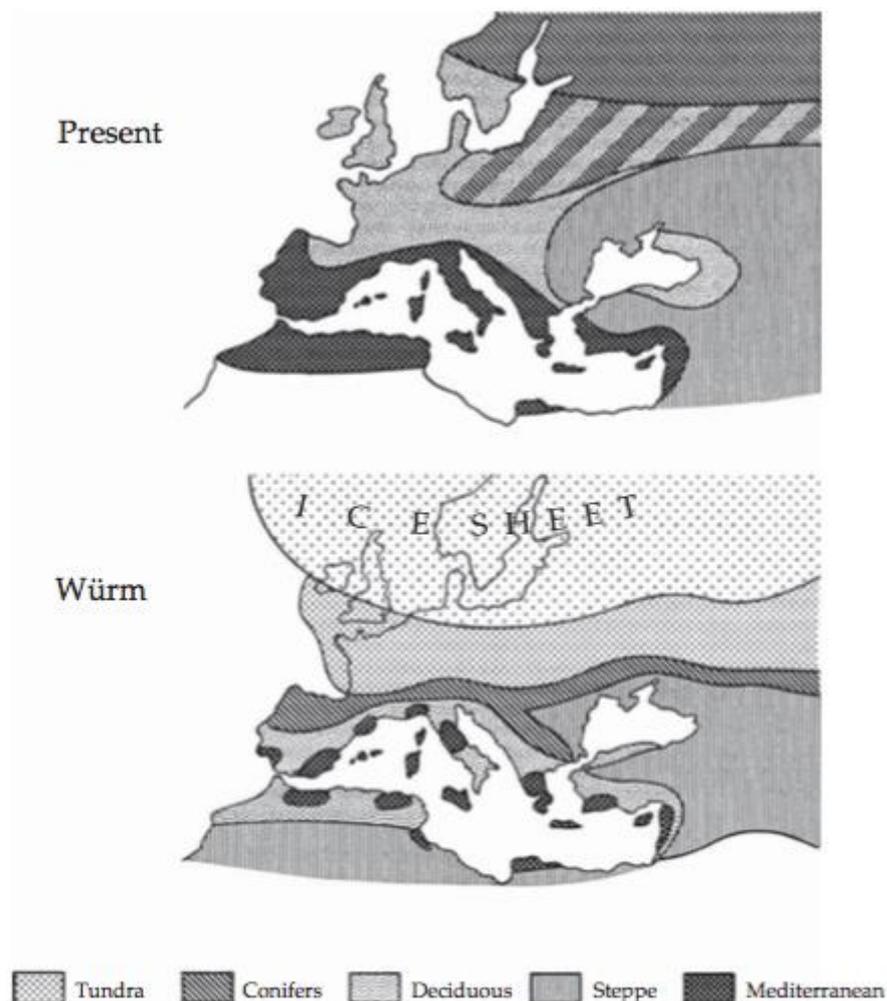


Figura 6 Rappresentazione schematica delle principali fasce di vegetazione in Europa e Nord Africa attualmente e durante la più grave fase della glaciazione Würm (30 000 years BP) (after Brown and Gibson 1983, in Blondel 1995).

Le prime calotte glaciali dell'emisfero nord iniziarono a crescere circa 2.5 Ma fa, e le alternanze tra fasi glaciali ed interglaciali investirono in modo ciclico le regioni più meridionali. Per queste regioni dominate dai ghiacci, quindi il Quaternario deve essere considerato come un'epoca

complessivamente fredda, interrotta periodicamente da catastrofici eventi di incremento temporaneo della temperatura, caratterizzati da condizioni climatiche analoghe a quelle attuali (Davis, 1976). Di conseguenza la relativa stabilità climatica registrata durante gli ultimi 8000 anni va intesa come un'eccezione, e la distribuzione biogeografia attuale costituisce l'effetto di una fase interglaciale di tipo piuttosto raro nella storia dell'Europa e del Medio Oriente (Blondel & Aronson, 1999). Attualmente il clima mediterraneo mostra temperature medie annue generalmente comprese tra i 14°C e i 18°C, e gelate e precipitazioni nevose sono rare (localizzate sulle cime dei rilievi) o mancano del tutto. La piovosità media annua oscilla intorno a valori di circa 400-800 mm, ma è concentrata nel periodo autunnale-invernale, mentre in primavera le precipitazioni diminuiscono fino a diventare molto rare nel periodo estivo. Se si analizzano singoli territori localizzati, si identificano però numerosi esempi di aree microclimatiche caratterizzate da regimi termici e idrici molto diversi e talvolta peculiari, che aggiungono eterogeneità di risorse e nicchie ecologiche. In questo contesto, le formazioni insulari, anche per l'effetto mitigante del mare che le circonda, offrono un'ampia varietà di gradienti ambientali su superfici relativamente ridotte.

Le isole maggiori del Mediterraneo infatti, in posizione centrale rispetto alle dinamiche filogeografiche, ospitano oggi cenosi di rara complessità, alla cui formazione contribuiscono sia le essenze relittuali dei rifugi glaciali, sia specie subtropicali di origine meridionale, nonché svariati taxa che dotati di capacità di dispersione su lunga distanza hanno dato luogo a nuove popolazioni in territori anche molto lontani da quelli originari: un tipico pattern mediterraneo frutto di differenziamento in numerosi endemismi e distribuzioni disgiunte.

STORIA DELLA VEGETAZIONE NEL MEDITERRANEO

Sebbene gli ecosistemi del mediterraneo si possano considerare giovani, in realtà sono composti da specie che hanno origine in quasi tutti i regni biogeografici conosciuti. Alcuni segni storici, inclusi i resti fossili dell'ultimo Terziario, ci mostrano l'origine e il ricambio della biocenosi del Mediterraneo degli ultimi milioni di anni. I movimenti tettonici, il vulcanismo, il clima e la complessa topografia e geologia hanno svolto un ruolo importante nella formazione fisica e nella nascita della regione (Blondel et al., 2010). La flora del Mediterraneo oggi è un mix complesso di gruppi tassonomici la cui origine biogeografica, l'età e la storia evolutiva varia enormemente. I cambiamenti climatici avvenuti dal Pliocene in poi sono stati responsabili della scomparsa di molte specie di piante subtropicali (*Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Palmae*, ecc.) che ricoprivano la maggior parte del paleartico occidentale, la cosiddetta flora Madrean-Tethyan (Axelrod, 1975). Tra le specie di questa flora termo-igrofila, le specie del genere *Laurus* sono reperti emblematici della flora subtropicale tetiana, usata per dedurre il loro deterioramento climatico durante il Plio-Pleistocene. Rodriguez-Sanchez e Arroyo (2008) hanno scoperto che la specie del genere *Laurus* occupavano preferibilmente aree calde umide con minori stagionalità. Le vaste aree adatte per questa specie si sono estremamente ridotte durante il Pleistocene, solo alcuni ripari umidi ne hanno permesso la persistenza a lungo termine fino ad oggi all'interno del bacino del Mediterraneo, della Transcaucasia e delle isole Macaronesie (Blondel et al., 2010). Potrebbe essere possibile che le condizioni climatiche future ristabiliranno le aree in precedenza adatte per queste specie. Esistono cinque gruppi principali che predominano sulla flora del bacino mediterraneo le quali differiscono tra loro per le origini biogeografiche (Blondel et al., 2010).

1- Componenti Afro-tropicali

Il primo gruppo comprende piante che si differenziano nei tropici aridi del continente africano e delle regioni adiacenti nell'era del Mar Tetide, prima che la deriva dei continenti separasse il nuovo mondo dall'Eurasia (Blondel et al., 2010). Alcune specie sempreverdi a foglia dura si possono trovare anche nella California centrale e meridionale e in altre parti aride del Nord e del sud America. Tra gli elementi Afro tropicali di antica discendenza, i cosiddetti reperti palaeotropicali, fanno parte i generi sempreverdi tipo, *Asparagus*, *Capparis*, *Ceratonia*, *Chamaerops*, *Jasminum*, *Nerium*, *Olea* e *Phillyrea* (Quezel, 1985). Famiglie di piante distribuite oggi perlopiù nei tropici ma che hanno, una o alcune rappresentanze, nelle foreste e macchie del Mediterraneo, includono: *Aquifoliaceae*, *Arecaceae*, *Aristolochiaceae*, *Fabaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae*, *Salvadoreaceae*, e *Vitaceae*. Durante i periodi caldi del Miocene/Pliocene e del Pleistocene tutte queste piante come anche alberi, arbusti e piante rampicanti erano comuni in tutto il Mediterraneo, adesso invece, sono limitate solo alle zone umide e calde del bacino (Blondel et al., 2010). Le specie tassonomiche di questo gruppo erano anche presenti nell'area molto prima dell'inizio del clima tipico Mediterraneo del Pliocene, circa 3.2 milioni di anni fa, oppure sono arrivate recentemente durante l'ultima glaciazione; sono sopravvissute, nonostante gli sconvolgimenti dell'ultimo Terziario e Quaternario, come confermano i resti fossili trovati nel sud dell'Europa (Palamarev, 1989). Una percezione interessante e importante dal punto di vista biologico è l'estinzione su larga scala dovuta alle glaciazioni del Pleistocene della flora della Macaronesia, incluse le isole Canarie (Juan et al., 2000) la cui flora, ha sì affinità con molte altre aree biogeografiche, ma senza dubbio ha anche tratti distintivi del Mediterraneo (Sunding, 1979; Shmida e Werger, 1992). Per questa ragione presentano una finestra interessante sul passato del Mediterraneo, in altre parole rappresentano un deposito della paleoflora e della formazione di vegetazione che ha predominato molto nel bacino del

Mediterraneo durante il Miocene, ma che sono ormai quasi tutti scomparsi (Quezel e Medail, 2003). Questa flora particolare include tassonomie di alberi e cespugli sempreverdi di molte famiglie di origine paleotropicali (Blondel et al., 2010). Sono presenti ancora molte macchie di foreste miste su numerose isole più occidentali e più umide delle Canarie (la Palma, Tenerife e Gran Canaria), che ci danno un'idea di come dovevano essere molte foreste del bassopiano mediterraneo durante il Miocene e il Pliocene (Suc, 1984). Ci sono tre specie di piante, per esempio, *Erica arborea*, *Andropogon distachyos* e *Hyparrhenia hirta*, che mostrano una distribuzione geografica simile all'ulivo (Besnard et al., 2007). Sono presenti nel bacino del Mediterraneo, nella Macaronesia, nelle montagne del Sahara, dell'Africa tropicale e nell'Arabia e indicano chiaramente una storia comune nella distribuzione delle piante tra l'Africa e il Mediterraneo (Quezel, 1978). Studi recenti sul genere *Erica* (McGuire e Kron, 2005) e sulla famiglia delle Araceae (Mansion et al., 2008) forniscono esempi della profonda storia di questa regione affascinante e complessa. Oltre ai collegamenti tropicali, ci sono anche evidenti relazioni tra la flora del Mediterraneo e le formazioni semiaride e aride di tutta l'Africa. Questa antica componente chiamata Rand- flora include il complesso delle piante di olivi e l'endemico albero di Argan del sud ovest del Marocco. Un terzo sottogruppo viene a volte chiamato Sudaniano ed è rappresentato in alcune parti a sud del bacino come lingua di penetrazione di alcune parti del Nord Africa e lungo la valle del Mar Nero tra Israele e Giordania (Zohary, 1973) (Fig.7). Quest'area di distribuzione della cosiddetta striscia sudaniana si allunga dalla costa atlantica a sud della Mauritania, attraverso l'Africa sub sahariana, fino alle coste del Mar Rosso, e riappare in alcune parti dell'India subcontinentale; sono specie, infatti che mostrano una distribuzione disgiunta (Blondel et al., 2010).

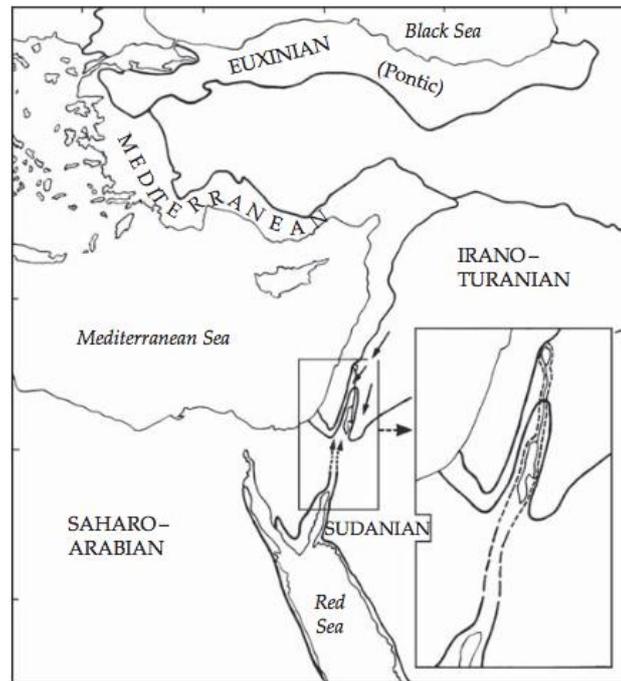


Figura 7 Suddivisione fitogeografica del mediterraneo orientale e nel riquadro, del Libano, Israele e Giordania nord orientale, che mostrano “lingue di penetrazione” Irano-Turricane e Sudaniane nell’area del mediterraneo (dopo Zohary 1973; Shmida e Aronson, 1986).

Infine, ci sono casi problematici, tipo le specie arboree di *Acacia* della savana africana presenti anche nelle frange meridionali del Mediterraneo, a nord del Sahara e nell'area del Mar Morto insieme ad alberi come *Zizyphus*, *Balanites*, e *Salvadora persica* e un numero di rampicanti di famiglie tropicali come Menispermaceae e Asclepiadaceae; anche la *Phoenix dactylifera* può essere considerata parte di questo gruppo (Blondel et al., 2010).

2- Componenti Olartiche

La seconda categoria include molte specie di famiglie di origine settentrionale, extra-tropicale. Alcune si sono stabilite nel Mediterraneo durante l'ultimo Pliocene, prima della prima glaciazione e sono sopravvissute nelle zone fredde e più umide nei quadranti Nord-Ovest e Nord Est del bacino (Blondel et al., 2010). Questo gruppo include, *Platanus orientalis*, *Juglans regia*, *Corylus avellana* e il faggio. Molte delle piante di origine boreale o olartica sono presenti anche nella flora delle zone temperate che costituiscono la maggior parte della vegetazione che si trova oggi nell'Eurasia occidentale, questo gruppo include, i genere di latifoglie tipo, *Acer*,

Alnus, *Betula*, *Fagus*, *Quercus*, e *Ulmus* ma anche molti taxa erbacei come *Aquilegia*, *Doronicum*, e *Gentiana*. Le vaste montagne del Mediterraneo settentrionale hanno giocato un ruolo fondamentale per la sopravvivenza di questi taxa, durante le glaciazioni, in quanto sono state utilizzate come riparo e hanno permesso la sopravvivenza di molte specie (Blondel et al., 2010). Ai confini settentrionali dei quadranti nord-occidentali del bacino, le province Ponto e Hyrcania della regione euro siberiana sono popolate da un alto numero di taxa e formazioni che si mescolano tra loro e contribuiscono alla vegetazione attuale del Mediterraneo specialmente nelle aree condizionate dall'attività umana. La provincia del Ponto è molto ricca di sempreverdi come il pino, l'abete e il rododendro. La provincia dell' Ircania invece è ricca di alberi decidui tra i quali *Parrotia persica* della famiglia delle Hamamelidacee. Reperti arcto-terziari presenti nel passato nelle varie zone dell'Europa occidentale, oggi sono presenti nei versanti medio alti delle montagne Alburz a sud del Mar Caspio insieme a *Ostrya*, *Zelkova*, varie querce e *Rhamnus*. Questi alberi e cespugli colonizzano e occupano insieme vaste aree di foreste di faggio degradate (Blondel et al., 2010). Sono esempi di taxa di una flora più xerica che ha sostituito quella mesofila dopo che l'habitat dei faggi è stato distrutta dall'uomo (Djamali et al., 2008a). La flora alpina del Ponto e dell'Hyrcania mostra anche molti collegamenti con la vegetazione della zona subalpina nelle montagne orientali del Mediterraneo (Djamali et al., 2008b).

3- Componenti irano-turaniani

Il terzo gruppo fa parte della flora mesogeana dell'arcto-Terziario ed è costituita da molti "old colonist" della nostra area come *Artemisia*, *Ephedra*, *Haloxylon*, *Pistacia*, *Salsola*, e *Suaeda* il cui centro di diversità lo troviamo nelle steppe semiaride dell'Asia centrale, dove le estati sono eccezionalmente calde e gli inverni estremamente freddi e secchi (Blondel et al., 2010). Le cosiddette steppe-forestali sono presenti in questa vasta regione fin dal Terziario superiore, se non prima, ma sono degradate a causa di secoli e secoli di cattiva gestione e sfruttamento delle

risorse naturali. A causa di ciò quest'area è caratterizzata lo più da vaste steppe i cui alberi e cespugli sono stati utilizzati come legna da ardere. L'albero di Giuda e lo *Styrax officinalis* sono presenti anche se in modo ristretto nei quadranti occidentali del Mediterraneo occidentale (Fritsch, 2001) e rappresentano le componenti decidue della flora mediterranea, mentre nel quadrante nordorientale sono abbondanti e vengono usati come bioindicatori della zona termo mediterranea. Zohary (1973), Magyari e altri (2008), sostengono che l'elemento orientale della flora balcanica abbia raggiunto l'Europa sud-orientale prima dell'Olocene, probabilmente attraverso la pianura della Tracia durante l'ultimo stadio glaciale del Quaternario ma non più tardi dell'ultima glaciazione Weichseliana (Würm circa 10.000-15.000 anni fa) (Fig. 8).



Figura 8 Rotte di colonizzazione post-glaciali di alcuni animali e piante europee. Le frecce indicano la direzione delle vie di espansione verso nord. Le linee nere spesse indicano zone di contatto tra le popolazioni precedentemente separate che emergono dai loro rispettivi rifugi (dopo Taberlet et al. 1998).

Comunque, nell'Olocene, questo schema si sarebbe intensificato quando la trasformazione da parte dell'uomo e la semplificazione degli ecosistemi ha portato le piante dagli habitat più xerici a colonizzare quelli più mesici piuttosto che il contrario. Si può chiamare la legge di Zohary,

sebbene lui stesso nel 1962 la definì come "guida sull'espansione delle piante nel deserto". Questa legge non solo spiega perché la regione irano-turaniana ha contribuito con molti più taxa nella regione mediterranea, ma probabilmente spiega anche perché uno schema così intrecciato si riscontra nelle terre di confine (Blondel et al., 2010). Il fattore umano diretto deve essere comunque considerato quando si parla dell'intrusione di elementi irano-turaniani: quasi tutti i gli alberi da frutto e i noci coltivati in questa regione hanno quest'origine, per lo più nella famiglia dei meli (Rosaceae). Compresi il biancospino, il melo e il mandorlo, il pero, il frassino di montagna ed almeno altri otto generi coltivati dall'uomo in tutto il bacino. Questi taxa si sono diffusi perché portati dall'uomo in tutto il bacino. Un livello molto elevato di ibridazione intra ed interspecifica può spiegare le diverse origini di decine di taxa di questi gruppi che ora si trovano in Europa e Nord Africa (ad es. Aldasoro et al. 1998). È notevole anche la presenza di un numero maggiore di specie di Querce decidue nel Mediterraneo orientale rispetto a quello occidentale. Tutte mostrano forti affinità con il gruppo di querce trovato più a est nella regione irano-turaniana e alle pendici dell'Himalaya. In questo contesto è incredibile l'assenza totale di pini dalla regione irano-turaniana, mentre alcune specie e sottospecie di *Pinus* sono presenti nella regione mediterranea. Lo stesso vale per le querce di cui almeno 25 specie sono presenti in questa regione (Blondel et al., 2010). I pini e le querce possono essere considerati validi bioindicatori del regno Mediterraneo, anche grazie all'intervento dell'uomo (Richardson et al., 2007).

4- Componenti arabo-sahariane

La quarta categoria comprende taxa dai vasti deserti e semideserti arabo-sahariani che hanno contribuito in modo significativo alla diversità della flora e dei paesaggi locali nelle regioni aride a sud e a sud-est del bacino del Mediterraneo (Blondel et al., 2010). Questa componente xerofitica della flora, desertica e stepposa, sembra essere antica, risalente fino al Terziario

inferiore. Ad ogni modo, nonostante la legge di Zohary, pochi elementi di questa componente si sono estesi al Nord diventando parte dell'ecosistema contemporaneo del Mediterraneo. Tra quelli sopravvissuti c'è un misto di specie che sembra essersi inserito durante le fluttuazioni climatiche a lungo termine del Pleistocene. Come già discusso per gli elementi sudaniani, è difficile distinguere tra i due gruppi. Questi elementi includono taxa delle *Chenopodiaceae*, *Zygophyllaceae* (*Balanites*, *Peganum*, *Tribulus*, *Zygophyllum*), poche erbacee perenni e altre (Zohary, 1973; Quezel, 1985). Attualmente la loro distribuzione coincide con la frontiera al limite del deserto- mediterraneo, ma con il riscaldamento globale, a cui stiamo andando incontro, non si può escludere che esse estendano il loro range di distribuzione anche più a nord (Blondel et al., 2010).

5- Componenti indigene

Questa categoria include migliaia di elementi autoctoni della cosiddetta flora mesogeana. Si sono differenziate dopo l'inizio dell'Oligocene all'interno delle regioni costiere attorno al mar Tetide specialmente sulle microplacche tettoniche che si sono sparpagiate tra l'Africa, a sud, e il super continente Eurasia, a nord (Quezel, 1985) (Blondel et al., 2010). Questa flora include le piante di fragole e le querce sempreverdi sclerofille considerate indigene dei taxa mediterranei, o paleoendemiche, insieme alle specie native di *Helianthemum*, *Lavatera*, *Salvia*, *Cupressus*, *Pinus*, e *Juniperus*. Secondo Thompson (2005), sia la penisola iberica sia quella balcanica sono particolarmente ricche di generi che si sono diversificati in modo dilagante in tempi recenti (ad es. *Genista*, *Narcissus*, *Linaria*, *Thymus* e *Teucrium* nella penisola iberica e *Silene* e *Stachys* nei Balcani). Questi generi paleoendemici sono presenti anche in alcune aree che evidenziano la complessità dell'evoluzione delle piante nel Mediterraneo. Un altro punto minore, ma cruciale, sono gli elementi antropogenici che distinguono la subflora di circa 1500 segetali e ruderali annuali che si sono evolute localmente (Zohary, 1973) e che sono presenti nei campi, nei

pascoli e ai lati delle strade. Alcune dozzine di questi taxa di gruppi autoctoni hanno una distribuzione molto limitata. Circa 200 di essi sono endemici nel Mediterraneo e nel medio oriente. Tra queste, un gran numero di generi endemici sono rappresentati da una o poche specie come *Bunias* e *Calepina* (Brassicaceae), *Cardopatium* e *Ridolfia* (Asteraceae), *Bifora*, *Exoacantha*, *Smyrniopsis* (Apiaceae), e molte altre. Come risulta dalla complicata storia del bacino, le flore paleoendemiche e neoendemiche sono presenti le une vicino alle altre; queste ultime appartengono ai gruppi ancestrali comparsi nella regione dopo le migrazioni e il differenziamento, esempi sono: *Amelanchier*, *Cistus*, *Centaurea*.

In conclusione possiamo riassumere la storia della flora mediterranea nel modo seguente (Blondel et al., 2010): durante la prima parte del Terziario, fino all'Oligocene, la flora era tipicamente tropicale, con un misto di paesaggi forestali e di savane con una struttura e una composizione molto differente rispetto a quella odierna. Dopo l'inizio dell'Oligocene e specialmente alla fine del Miocene e del Pliocene, quando si è stabilizzato il clima tipico Mediterraneo (circa 2.8-3.2 milioni di anni fa) si sono create aree più aride e semiaride a sud e a est e più mesiche verso nord, la tipica flora mediterranea, poi, si è sviluppata e differenziata progressivamente nella forma e nelle diversificazioni con cui la conosciamo oggi. Dalla crisi di salinità del Messiniano fino alla fine del Pliocene e l'inizio del Pleistocene, c'è stato un ricambio della flora con la scomparsa di molte specie tropicali. Questa flora tropicale è stata sostituita progressivamente dalla flora moderna, che include elementi storici disparati come i taxa arabo-sahariani (*Retama*, *Lygos*), specie di steppa (*Artemisia*), molte autoctone mediterranee (*Arbutus*, *Ceratonia*, *Quercus*, *Pistacia*, *Myrtus*, e *Cistus*) e elementi boreali (*Alnus*, *Fraxinus*, *Tilia*, e *Ulmus*). Circa 2.3 milioni di anni fa un periodo di siccità ha portato allo sviluppo e all'espansione di associazioni di steppe (*Artemisia*, *Ephedra*) e anche di quelle xerofite mediterranee come *Phillyrea*, *Olea*, *Cistus*, *Leccio* e *Lentisco* (Suc, 1980) (Blondel et al., 2010).

TAXA ATTUALMETE A DISTRIBUZIONE RELITTA

Il cambiamento climatico minaccia di cambiare radicalmente e contrarre le distribuzioni di molte specie e comunità vegetali, ma questo non sarà la prima volta che accade (Milne, 2006). La risposta delle piante alle variazioni naturali del clima nel corso degli ultimi 65 milioni di anni può essere utilizzato per prevedere gli effetti dei futuri cambiamenti climatici (Pennington et al., 2004).

Il raffreddamento climatico nella seconda parte del Terziario (65-2 milioni di anni fa) ha forzato grandi assemblamenti di biota subtropicali, caldo temperati, a ritirarsi da distribuzioni sud circumboreali a latitudini medio-alte verso grandi aree di rifugio che avevano conservato il clima caldo umido di cui avevano bisogno (Milne, 2006).

Questi rifugi sono in E Asia, N America sud-orientale, N America occidentale e SW Eurasia (all'incirca fino alla Turchia), e le flore in questione sono quindi chiamati flore relitte del Terziario (Tiffney, 1985a, b; Wen, 1999; Milne e Abbott, 2002).

Le flore relitte del Terziario hanno da tempo attirato l'interesse degli studiosi perché oltre 100 generi si trovano in disgiunzione tra due o più di queste regioni (Wood, del 1972; Wen, 1999; Milne e Abbott, 2002), con disgiunzioni molto più comuni tra N America sud-orientale e E Asia (Xiang et al., 2000; Donoghue e Smith, 2004, Milne, 2006) (Fig. 9).

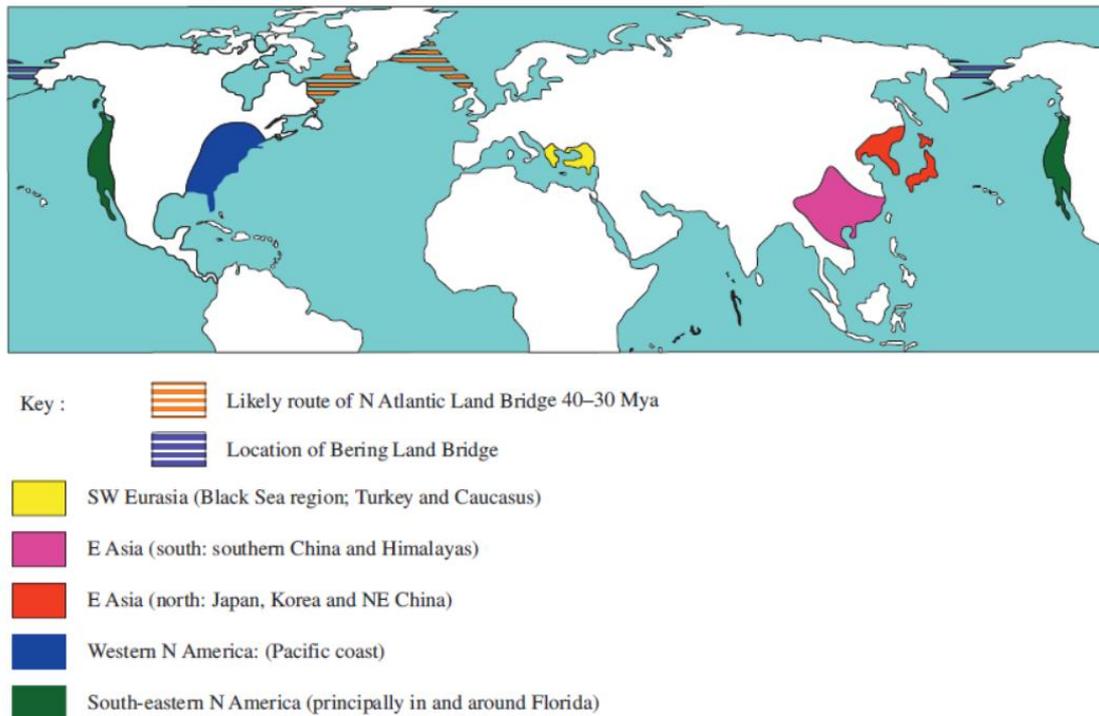


Figura 9 Principali aree in cui sono presenti flore relitte del Terziario, e ponti di terra del Terziario tra l'Eurasia e N America. Il percorso indicato per il ponte di terra N Atlantico è il 'ponte di Groenlandia-Faeroes' (Xiang et al., 2005), l'unico collegamento che avrebbe potuto persistere 40 milioni di anni fa (vedi Milne e Abbott, 2002). Prima di questo periodo, esisteva un secondo collegamento più a nord tra la Groenlandia e la Scandinavia (per una descrizione dettagliata, vedere Tiffney, 1985b). Il ponte di terra di Bering esisteva per la maggior parte del periodo terziario, ma si è spostato progressivamente verso sud nel corso di questo periodo, ed era ben all'interno del Circolo Polare Artico nel primo e medio Terziario (Milne e Abbott, 2002). Molti riferimenti trattano l'Asia come un'unica area, ma questa figura segue Donoghue et al. (2001) e Milne e Abbott (2002) nel separare le parti nord e sud di questa area rifugio (tratta da Milne I.R., 2006).

L'ultimo collegamento terrestre durante il Terziario tra Eurasia e N America è stato il ponte di terra di Bering (BLB), che si trovava vicino al Circolo Polare Artico (Tiffney, 1985a, b; Tiffney e Manchester, 2001), ed è noto per aver vissuto un clima significativamente freddo da 15 milioni di anni fa in poi (Wolfe, 1994; White et al., 1997; Tiffney e Manchester, 2001). Questo raffreddamento potrebbe aver avviato una divergenza e speciazione tra le specie N Americane e le eurasiatiche di molti generi relitti del Terziario attraverso Beringia (Milne e Abbott, 2002), prima della separazione del ponte, 5.4-5.5 milioni di anni fa. Confrontando i dati paleoclimatici con i dati molecolari, che indicano il tempo di divergenza per molte coppie di specie disgiunte dell' E Asia-N dell'America, è possibile esaminare in dettaglio gli effetti del cambiamento climatico Beringiano. Quando inizia il periodo Terziario, N America e Eurasia sono stati separati in parti occidentali e orientali da vie marittime epicontinentali (Tiffney, 1985a; Tiffney e

Manchester, 2001). Allo stesso tempo, l'America N occidentale era collegata alla E Asia attraverso la BLB, mentre il N America orientale era collegato tramite la Groenlandia a nord-est Europa con una connessione nota come ponte di terra N Atlantico (NALB; Tiffney, 1985b). Reperti pollinici confermano che l'emisfero settentrionale è stato diviso in due regioni biogeografiche di cui una era N America occidentale più gran parte dell'Asia, e l'altra N America orientale più Europa (Tiffney, 1985a). I climi alle alte latitudini erano caldi e umidi, e le comunità forestali qui sviluppate erano una miscela di taxa di clima caldo-temperato, subtropicale e, c'era forse, anche la presenza di taxa tropicali (Milne, 2006). In realtà, il NALB, che si trovava più a sud rispetto alla BLB (McKenna, 1983; Tiffney, 1985b; Tiffney e Manchester, 2001), può essere servito come parte di un collegamento terrestre tra l'Africa e l'America per i taxa tropicali (Lavin et al., 2000; Xiang et al., 2005). Durante il Terziario superiore, le autostrade dei mari epicontinentali su N America e Eurasia si sono allontanate, rimuovendo o riducendo le barriere tra le parti occidentali e orientali di ogni continente, forse permettendo ad alcuni taxa di sviluppare modelli di ininterrotte distribuzioni circumboreali (Tiffney, 1985a; Tiffney e Manchester, 2001) (Milne, 2006) Tra allora ed oggi, quattro processi combinati hanno spezzato questa distribuzione. In primo luogo, con l'apertura dell' Oceano Atlantico si sciolse il NALB, anche se i tempi di questo avvenimento sono tutt'altro che certi. La Groenlandia fu l'ultima ad essere in contatto diretto con la Scozia circa 50 milioni di anni fa e la Scandinavia circa 40 milioni di anni fa (Tiffney, 1985b), ma l'attività dell' hotspot Islandese può aver formato un collegamento terrestre continuo dalla Groenlandia alla Scozia per qualche tempo dopo questo avvenimento, che affondò poi, pezzo per pezzo, diventando una catena di isole con spazi sempre più grandi fino a che rimasero soltanto l'Islanda e le isole Færøer (McKenna, 1983; Milne e Abbott, 2002; Xiang et al., 2005) (Milne, 2006). Collegamenti biotici in tutto il NALB furono quindi probabilmente persi molto gradualmente fino al Terziario medio, forse 25 o forse

anche 15 milioni di anni fa (Milne e Abbott, 2002). Il secondo e terzo processo furono il raffreddamento del clima e la desertificazione. Il raffreddamento climatico è avvenuto lentamente da 50-35 milioni di anni fa, per poi oscillare fino a 15 milioni di anni fa, dopo di che il clima si è raffreddato progressivamente, culminando nel Quaternario (2-0 milioni di anni fa) con le glaciazioni (Milne e Abbott, 2002) (Milne, 2006). Collegato a questo c'è stato lo sviluppo di cinture di climi relativamente aridi nella parte centrale di entrambi i continenti, in modo che flore di climi più umidi sono state ancora una volta divise in province orientali e occidentali sia dell' Eurasia che del N America (Tiffney e Manchester, 2001). Inoltre, una cintura, in direzione est-ovest, di condizioni aride esisteva in Asia orientale per gran parte del periodo Terziario, separando le regioni rifugio dell' E Asia in porzioni settentrionali e meridionali (Tiffney, 1985b; Tiffney e Manchester, 2001; Fig. 10), obbligando queste parti ad esporre affinità biogeografiche distinte (Donoghue et al., 2001; Milne e Abbott, 2002). Il quarto e ultimo evento è stata la scissione della BLB, nota con una certa precisione per essere avvenuta 55-54 milioni di anni fa (Gladenkov et al., 2002) (Milne, 2006). Tra di loro, questi eventi hanno frammentato le comunità forestali del Terziario precedentemente continue e le hanno confinate alle regioni caldo umide che ora occupano (Fig. 10).

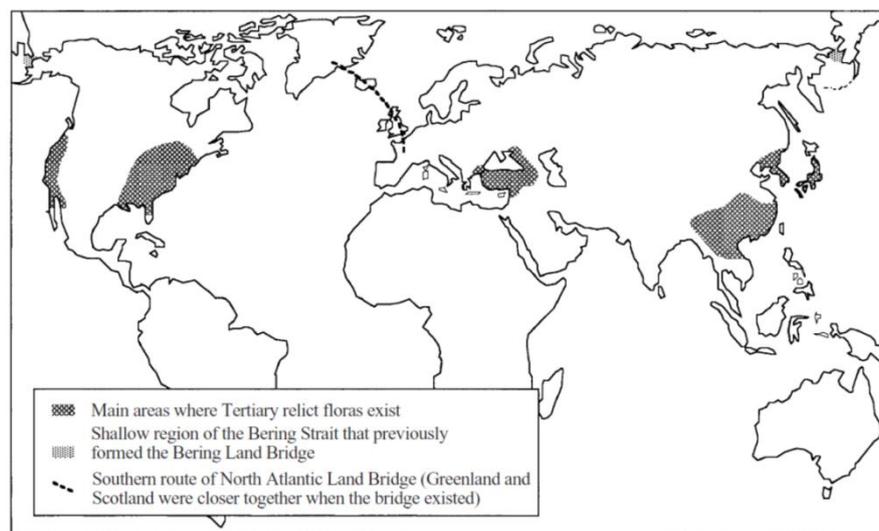


Figura 10 Principali aree in cui è presente flora relitta del Terziario, e probabili rotte di migrazione fra i continenti (Milne e Abbott, 2002).

Tuttavia, l'importanza relativa di questi eventi è, ancora oggi, oggetto di accesi dibattiti; per esempio, non è affatto chiaro se il raffreddamento climatico o la scissione effettiva della BLB è stato l'evento più importante nella rottura dei collegamenti biotici tra le flore del Terziario di E Asia e N America (Milne e Abbott, 2002). Sono stati utilizzati lavori di sistematica molecolare per indagare su quando e come i generi relitti del Terziario si siano spostati tra N America e Eurasia (Wen, 1999; Xiang et al., 2000, 2005; Donoghue et al., 2001; Milne e Abbott, 2002). Una filogenesi può indicare la migrazione transatlantica definendo una specie N americana come "sister species" di una del SW Eurasia, come in *Liquidambar* (Li e Donoghue, 1999) e *Styrax* (Fritsch, 1999), e la probabile storia dei modelli filogenetici più complessi può essere postulata mediante l'uso di metodi di analisi; quali l'analisi dispersione su lunga distanza-vicarianza (Ronquist, 1997; per gli esempi, vedi Xiang et al., 2005; Feng et al., 2005). Tuttavia, estinzioni di taxa relitti del Terziario, che si sono verificati in modo sproporzionatamente frequente in Europa (Milne e Abbott, 2002), possono rendere la filogenesi basata sui taxa esistenti, fuorviante, a meno che ad esse non si possano incorporare anche i dati fossili (Xiang et al., 2005) (Milne, 2006). La datazione molecolare può anche indicare quale percorso è stato utilizzato per spostarsi tra i continenti, più comunemente con date di divergenza che sono troppo recenti per la NALB, e che quindi favoriscono la BLB (Xiang et al., 2000; Milne, 2004). Tracciare la storia della flora ad epoche ancora precedenti, cioè individuare i centri di origine, è stato tentato, ma il vero problema è che è troppo complesso. Quanto detto implica che la maggior parte o la disgiunzione tra tutte le flore relitte del Terziario sia avvenuta con la vicarianza, ossia la suddivisione di una grande popolazione in due a causa della formazione di una barriera fisica o climatica tra loro, ad esempio la separazione della BLB o NALB, o attraverso l'estinzione locale a causa di cambiamenti climatici. Quando si è verificata la vicarianza, la datazione molecolare di divergenza tra due specie disgiunte fornisce una data che indica

quando la barriera li ha inizialmente separati ma potrebbe anche essere sorta prima, quindi permette la datazione di eventi abiotici in base a dati biotici, soprattutto quando i tempi simili di divergenza si trovano tra coppie di specie indipendenti ma distribuite in modo simile (Milne, 2006). Vi è, tuttavia, una soluzione alternativa; cioè che le piante possono spostarsi tra i territori. La dispersione a lunga distanza si verifica quando un singolo propagulo è trasportato attraverso una barriera (di solito un oceano), da una popolazione esistente su un lato, in modo da fondare una nuova popolazione dall'altro lato. La dispersione accidentale attraverso gli oceani accade di frequente tra gli uccelli, ma per generi di piante, l'istituzione con successo e la riproduzione da un solo seme portato tra i continenti, può accadere una volta ogni poche decine di milioni di anni per avere un grande impatto sulla biogeografia (Milne, 2006). La dispersione a lunga distanza è stata un'ipotesi impopolare tra i biogeografi perché è di natura altamente casuale, quasi impossibile da falsificare, e, a differenza della vicarianza non può normalmente essere legata a specifici eventi abiotici (McGlone, 2005). Vi è abbondanza di prove circostanziali che favorisce la vicarianza rispetto alla dispersione a lunga distanza per i mezzi con cui la maggior parte delle disgiunzioni relitte del Terziario sono avvenute. In primo luogo, le distribuzioni congruenti di tanti generi indipendenti sostengono una storia condivisa. Sebbene generi con distribuzioni identiche non necessariamente raggiungano simultaneamente o attraverso vie identiche, lo stesso risultato, il modello moderno è tuttavia ancora più coerente con la condivisione di biota tra masse di terra attraverso uno o più collegamenti terrestri di quanto lo sia con singole specie che viaggiano una per una attraverso eventi di dispersione imprevedibili (Milne, 2006). In secondo luogo, tra le regioni in cui si ritrovano flore relitte del Terziario, eventi di disgiunzioni tra E Asia e la parte orientale del N America sono sproporzionatamente comuni rispetto a quelli che coinvolgono la parte occidentale del N America o SW Eurasia (Donoghue e Smith, 2004), il che indica un preciso collegamento

biogeografico tra le prime due regioni, che sostiene ancora di più un modello condiviso di movimento via terra. Se la dispersione oceanica fosse stata importante, ci si aspetterebbe collegamenti tra sud-est N America e SW dell'Eurasia, o N America occidentale e E Asia (Milne, 2006). In terzo luogo, i generi con buoni reperti fossili sono noti per essere stati diffusi a latitudini abbastanza alte entro l'Eurasia, come predice l'ipotesi della vicarianza (Tiffney, 1985a; Milne e Abbott, 2002; Xiang et al., 2005) (Milne, 2006). In quarto luogo, i grandi semi di alcuni generi coinvolti, in particolare la castagne *Aesculus* e *Castanea*, sarebbero difficili da disperdere attraverso gli oceani (Milne, 2006). In quinto luogo, molti dei generi coinvolti hanno subito poche variazioni morfologiche da divergenza (ad esempio 'stasi'; Wen, 1999, 2001, Milne e Abbott, 2002), che è più coerente con un fenomeno di vicarianza di una vasta popolazione in due di quanto lo sia con eventi di dispersione a lunga distanza, perché quest'ultimo implica un effetto fondatore che è spesso il pilota per rapidi cambiamenti morfologici (Milne e Abbott, 2002) (Milne, 2006). Mentre questi punti insieme indicano che la vicarianza è stata quasi certamente molto più importante rispetto alla dispersione, nessuno di esso costituisce una forte evidenza tale da rifiutare una ipotesi di dispersione per un determinato genere. Per respingere la dispersione, sono necessarie prove concrete che sostengano l'ipotesi della vicarianza, al di là che ci fosse un collegamento terrestre intorno al periodo di divergenza. Metodi di analisi per ricostruire storie biogeografiche, come l'analisi dispersione-vicarianza (Ronquist, 1997), possono essere adattate per consentire una maggiore probabilità per la dispersione a lunga distanza (de Queiroz, 2005), ma non sono perfetti per valutare uno scenario che coinvolga la dispersione (Cook e Crisp, 2005). Inoltre la produzione di tali metodi indica solo la storia più probabile per il gruppo considerato, ed è essa stessa un'ipotesi; ma non è possibile escludere altre spiegazioni. Dove sono disponibili, i dati fossili possono essere combinati con i dati molecolari per fornire una prova molto forte della dispersione a lunga distanza (ad

esempio, *Symphonia*, Dick et al., 2003), o della migrazione su connessioni terrestri (ad es *Cornus*; Xiang et al., 2005); i dati paleoclimatici possono migliorare ulteriormente queste analisi (Feng et al., 2005); tuttavia, se i dati fossili sono assenti o scarsi, sarà necessario un altro tipo di approccio (Milne, 2006).

BIOGEOGRAFIA STORICA DELLA FAMIGLIA DELLE PLATANACEAE

Platanus fornisce un esempio eccellente se si considera il modello e il relativo tempo di formazione di barriere al flusso genico di tutto l'emisfero settentrionale. I dati ritrovati in letteratura (Feng et al., 2005) supportano l'ipotesi di una frammentazione di una continua distribuzione ancestrale (SE Asia, ((WNA + EUR), (ENA + MEX))); tenendo sempre presente che bisogna avere molta cautela quando si fanno interpretazioni biogeografiche. Partendo dal presupposto che la moderna distribuzione del subg. *Platanus* è approssimativamente simile alla sua distribuzione ancestrale, la spaccatura più profonda all'interno del set di relazioni nell'area (WNA (+ EUR), (ENA + MEX)) è coerente con un iniziale evento di vicarianza, come ad esempio il Mid-Continental Seaway che ha completamente separato il Nord America da ca. 105 a 70 milioni di anni fa (Smith et al., 1994), che colpisce taxa che sono ora per lo più confinati al Nord America. Uno scenario probabile è la vicarianza di alta latitudine conseguente negli antenati dei due grandi cladi di subg. *Platanus* (Feng et al., 2005). La seconda divisione più profonda all'interno del subg. *Platanus* comporta la disgiunzione intercontinentale dei taxa da WNA + EUR. C'è un precedente per la postulazione che queste due aree una volta erano legate da una continua paleoflora Madrean-Tethyan che ha abbracciato a bassa latitudine, zone sub-umide del Nord America e Eurasia sud-occidentale nel Terziario superiore quando i continenti erano più vicini (Axelrod, 1975). Ulteriori prove per le connessioni floristiche via NALB per lo più provengono da studi molecolari filogenetici di generi, come *Styrax* (Fritsch, 1996, 2001), *Cercis*

(Davis et al., 2002), e Arbutoideae (Hileman et al., 2001), anche se il sostegno di dati geologici e fossili sono scarsi (Wolfe, 1975; Fritsch, 1996; Liston, 1997; Milne e Abbott, 2002). Per il subclade *Platanus* che collega le aree di WNA+ Euro, è stato stimato un tempo minimo di divergenza con il sistema di calibrazione più conservatore che suggerisce 15 MYBP, che è il supporto ragionevole per l'ipotesi Madrean-Tethyan (Feng et al., 2005). In questo scenario, probabilmente elementi ancestrali del clade *P. racemosa*-*P. orientalis* devono essere stati più ampiamente distribuiti in aree subumide e sono stati successivamente sostituiti in ENA da un antenore *P. occidentalis* di clima temperato fresco e specie più mesiche, attraverso la dispersione a sud da latitudini più settentrionali. Megafossili con affinità con *P. racemosa* (*P. wyomingensis*; MacGinitie, 1969) suggeriscono una più ampia distribuzione per questo clade durante il Medio Eocene del Nord America occidentale, ma attualmente non esistono prove che dimostrino la presenza di questo clade nella documentazione fossile del Terziario di aree che sosterebbero un'ambigua rotta di dispersione Madrean-Tethyan (Feng et al., 2005). Infatti, il terziario dell'Europa contiene abbondanti dati fossili sul complesso deciduo di *P. neptuni*, ma la sua morfologia è un interessante mix di tratti trovati nel genere moderno, e specificamente, questo complesso fossile ha la tendenza a produrre sia foglie composte 5-foliolate e foglie semplici senza lobi, oltre ad infiorescenze solitarie più simili a quelle prodotte dai moderni *P. occidentalis*. Scenari alternativi per spiegare questa disgiunzione includono la vicarianza attraverso la BLB e la dispersione a lunga distanza. La potenziale connessione attraverso la BLB per una flora semiarida sembra improbabile, basandosi su ricostruzioni climatiche che suggeriscono che una combinazione di temperature fresche e di limitato sole invernale avrebbe precluso connessioni floristiche del Mediterraneo (Tiffney e Manchester, 2001). Inoltre, sono presenti molti fossili del Terziario superiore di Kamchatka (Maslova, 1997) e Alaska (Spicer et al., 1987) con le foglie trilobate del clade *P. occidentalis*, suggerendo che probabilmente gli

antenati di questo gruppo disperdevano alle alte latitudini in tutto il BLB. La dispersione a lunga distanza rimane anche una spiegazione altrettanto valida per questo motivo, soprattutto considerando il piccolo frutto a singolo seme o acheni prodotte da tutte le specie del genere. L'achenio con lunghi peli attaccati per la dispersione, in un primo momento sembrerebbe disperso dal vento, ma si può facilmente immaginare che frutti di questo tipo possano essere bloccati nel fango di avvallamenti rivieraschi, e poi attaccandosi alle zampe e alle piume degli uccelli, potrebbero essere trasportati in aree remote (Feng et al., 2005). Il rapporto del sister group di *P. occidentalis* var. *occidentalis* e *P. mexicana* var. *mexicana* è un primo esempio della parte orientale degli Stati Uniti-Messico orientale di disgiunzione floristica, e la stima del tempo di divergenza suggerisce il medio-tardo Miocene per questo evento di vicarianza all'interno del subg. *Platanus*. Graham (1973) concluse che quasi tutti i segmenti del tempo geologico dal Cretaceo potevano spiegare l'origine della flora temperata (ad esempio, *Liquidambar*, *Juglans*, *Populus*, *Ulmus*) nel nord dell'America Latina. Due ipotesi sono state avanzate (vedi Graham, 1999b). Una afferma che la flora temperata era dispersa nel nord dell' America Latina durante l'Eocene (Axelrod, 1975), mentre l'altra sostiene che i primi fossili assegnabili ad elementi temperati suggeriscono un'origine più recente, nel Miocene inferiore e Pliocene superiore (Graham, 1999b). Il tempo molecolare stimato per questa disgiunzione nel *Platanus* suggerisce che la dispersione a sud si è verificata prima del Pliocene, utilizzando anche dati fossili per *Platanus* che supportano questa datazione (Feng et al., 2005). Se la quantità apprezzabile di differenziazione all'interno del genere messicano *Platanus* è generalmente coincidente con il tempo, potrebbe essere plausibile, però, anche una presenza precedente del genere in questa zona. In *Fagus*, un tempo di divergenza nel Miocene inferiore è stato anche stimato per la coppia di specie vicarianti *F. mexicana* Camp. e *F. grandifolia* Ehrh. (Manos e Stanford, 2001). Stimare un periodo più recente per l'introduzione iniziale di flora temperata nel nord

dell'America Latina, come il Pleistocene (Deevey, 1949; Dressler, 1954) risulta incompatibile con i dati descritti. In *Platanus*, la vicarianza tra taxa del Nord America e Messico orientale è in linea con il costante sviluppo di clima arido in tutta la regione (Axelrod, 1975; Thompson, 1991; Graham, 1999a). I due più recenti eventi di vicarianza all'interno del subg. *Platanus* sembrano essere temporalmente congruenti (Miocene inferiore-Pliocene). Nel sud-est del Messico, le popolazioni di *P. mexicana* var. *mexicana* da Veracruz e *P. mexicana* var. *mexicana* dal Chiapas sono filogeneticamente distinti (Feng et al., 2005). Una spiegazione è che durante il tardo Miocene (circa 6 MYBP) l'Istmo di Tehuantepec ha subito una serie di sollevamenti e subsidenze, causando la formazione di una barriera tra il Golfo del Messico e l'Oceano Pacifico (Schuchert, 1935; Barrier et al., 1998). La divergenza di questi due subcladi coincide generalmente con i cambiamenti tettonici all' Istmo di Tehuantepec e suggerisce che *Platanus* è arrivato nella zona ad est dell'istmo prima della sua apertura. L'altro clade rappresentato da *P. racemosa* s.l., è supportato da due subcladi che corrispondono alle popolazioni del Nord America occidentale (sud della California e Baja California) e del sud-ovest del nord America (Arizona). Questo modello biogeografico non è senza precedenti. Le Betulaceae, *Alnus oblongifolia* Torr. e *A. rhombifolia* Nutt. sono buoni esempi di specie ripariali con una simile distribuzione disgiunta (Chen e Li, 2004). Nelle Fagaceae, il modello è stato osservato per la specie boschiva di quercia *Quercus engelmannii* Greene e *Q. oblongifolia* Torr., taxa con affinità con altre querce messicane (Nixon e Muller, 1997). Variabilità intraspecifica nelle querce, *Q. palmeri* Engelm., si accorda anch'essa con questo modello, le popolazioni dell' Arizona sono più o meno distinte da quelle del sud della California e di Baja California (Manos, 1993). Come sottolineato da Axelrod (1988) con l'ausilio dei fossili e delle ricostruzioni climatiche (Thompson, 1991), l'area che comprende il sud della California e l'Arizona era più umida nel Miocene, sostenendo la diffusione di boschi e comunità ripariali. Con l'aumento di

raffreddamento ed essiccazione, la parte centrale di questa zona è situata adesso, in parte, all'interno dei deserti Mojave e Sonora. Nel Miocene inferiore e nel Pliocene superiore, questi deserti si sono ampliati e sono geologicamente ruotati producendo una efficace barriera lungo un corridoio est-ovest, che separa le popolazioni di ex specie un tempo diffuse (Axelrod, 1988; Graham, 1999a). Le aree su entrambi i lati di questa barriera continuano a dare sostegno alla presenza di disgiunti relitti forestali ripariali come *Platanus* in aree semi-aride (Feng et al., 2005).

IL GENERE PLATANUS

La famiglia delle Platanaceae comprende alberi maestosi, decidui e raramente sempreverdi. Linneo basò la sua descrizione della specie di *Platanus orientalis* e *Platanus occidentalis*, differenziandole soprattutto in base ai lobi delle foglie, che è il carattere comunemente usato finora per distinguere le due specie. I primi studi sul sistema di classificazione delle Platanaceae fu condotto da Cronquist (1981) il quale basò le sue ricerche su semplici similitudini morfologiche, in particolare egli aveva riscontrato delle caratteristiche in comune alla sottofamiglia delle Hamamelidaceae, nella forma delle foglie e dei fiori. Tale evidenza lo pose a sostenere che avessero una stessa origine oppure che si potesse trattare di un esempio di omoplasia. In seguito, con l'evolversi di nuove ricerche, le teorie di Cronquist non furono confutate. Analisi filogenetiche di sequenze di DNA da loci multipli, hanno indicato che la famiglia delle Platanaceae è uno dei primi rami delle eudicotiledoni e "sister group" delle Proteaceae (Nixon & Poole, 2003) nel gruppo delle Eudicotiledoni, escludendo così ogni possibile relazione tra i due taxa. Queste famiglie a loro volta comprendono il "sister clade" delle Nelumbonaceae (Hoot et al., 1999; Soltis et al., 2000). Le Platanaceae sono oggi riconosciute da quasi tutti i tassonomi, come formate da un unico genere *Platanus* L. che è poi

suddiviso in due subgeneri: il monotipico *Castaneophyllum* (J.F.Leroy) e il sottogenere *Platanus* (J.F.Leroy). Oggetto di studio per distinguere i due sottogeneri di Platanaceae e i loro percorsi evolutivi è stato il polline: nel primo Cretaceo infatti il polline era comparativamente piccolo e insieme con il perianzio, più sviluppato nei fiori staminati, ciò ha permesso di affermare che vi era un diverso meccanismo di impollinazione nelle prime forme ritrovate, probabilmente con una dispersione del polline da parte degli insetti (entomofila) e non attraverso il vento (anemofila). Il subgenere *Platanus*, comprende sette specie diverse, ha infiorescenze terminali o laterali, è deciduo, ha foglie palmato lobate con venature palinactinodrome e gemme ascellari che sono ricoperte alla base da petiole (gemme intra petiolate), mentre il subgenere *Castaneophyllum* J.-F. Leroy ha infiorescenze ascellari, è sempreverde, ha foglie ellittiche con venature pinnate e nessuna gemma intrapetolare (Nixon & Pool, 2003) esso include solo *Platanus kerrii* Gagnep., che a differenza dell'altro subgenere è un'isolata specie relitta con foglie ellittiche, penninervie e sempreverdi, con un'infiorescenza più complessa e una diversa morfologia del polline (Carpenter et al., 2005). La distribuzione di *Platanus* presenta analogie al classico pattern disgiunto di molti taxa dell'emisfero settentrionale spesso considerati relitti del Terziario (Wood, 1972; Wen, 1999; Milne e Abbott, 2002; Donoghue e Smith, 2004). Il range di distribuzione comprende anche il Nord dell'America Latina, dove la maggior parte della diversità delle specie e complessità tassonomica risiede all'interno del subg. *Platanus* (Nixon e Poole, 2003). Le specie del subgenere *Platanus* sono state soggette a una maggiore revisione morfologica da Nixon e Poole (2003), che hanno riconosciuto, in esso, due gruppi di specie. Un gruppo è costituito da un taxa occidentale nordamericano, *P. racemosa* (varietà *racemosa* e *wrightii*) e *P. gentryi* e il taxa dell'Europa meridionale (Italia meridionale, sud della penisola balcanica, e Turchia) e del medio Oriente, *P. orientalis*. Il secondo gruppo è puramente americano composto da *P. mexicana* (varietà *mexicana* e *interior*), *P. rzedowskii* e *P.*

occidentalis (varietà *palmeri* e *occidentalis*) situati lungo un gradiente Nord-Sud dell'America (Nixon e Poole, 2003). In Inghilterra, le due specie di platani produssero spontaneamente, attorno al 1670, un ibrido fertile, *Platanus hybrida* Brot., "il platano comune", che può crescere anche in zone molto fredde ed è molto più vigoroso dei progenitori; esso viene così coltivato a scopo ornamentale in tutte le zone temperate della terra, soprattutto nelle piane irrigue, nei parchi e lungo le strade.

L'unica specie di Platanaceae sopravvissute nel Vecchio Mondo è *Platanus orientalis*, con un areale che si estende dall'Europa orientale all'Asia occidentale, tipica dei boschi ripariali della Sicilia orientale e caratteristica per la foglia profondamente incisa. Largamente coltivato nell'Europa meridionale, non sopporta il clima dell'Europa settentrionale, dove non giunge l'influenza moderatrice del mare; in queste regioni è stato invece introdotto dal Nord America, poco dopo la scoperta di questo continente, la specie *Platanus occidentalis* L. Nell'inventario della flora italiana non native (Celesti et al., 2009), il *Platanus orientalis* non è citato, confermando che è stato valutato come un elemento indigeno e non come archeofita (Rosati et al., 2015). Tuttavia diversi autori in passato hanno messo in dubbio la sua origine in Europa, al di fuori delle regioni del Mediterraneo orientale (ad esempio Marchi et al., 2013).

DATI PALEOBOTANICI: UNA PANORAMICA DELLA PRESENZA NEL PASSATO DI PLATANUS IN EUROPA

La famiglia delle Platanaceae vanta un eccellente numero di fossili risalenti al Cretaceo inferiore in Europa ed è relativamente continua dalla metà del Cretaceo nel Terziario (Manchester, 1986; Crane et al., 1988, 1993; Manchester, 1994; Maslova, 1997, 2003; Kvacek et al., 2001; Kvacek e Manchester, 2004), con i più antichi organi riproduttivi registrati a partire dalla metà dell'Albiano (Crane et al., 1993) e buone prove per una sostanziale diversificazione nel Terziario

superiore (Friis e Crane, 1989; Magallon et al., 1997). I più antichi fossili di *Platanus* (foglia e struttura riproduttiva) sono stati scoperti in Germania (Tschan et al., 2008). Macrofossili appartenenti a diverse specie di *Platanus* sono stati trovati nel Terziario di diversi paesi europei, ad esempio, *P. neptuni* dal Paleocene/Eocene della Scozia, dall' Eocene di Germania e Repubblica Ceca e dall' Oligocene della Germania (Kvacek, 2010), Serbia (Djordjevic'-Milutinovic' & Dulic', 2009) e Grecia (Velitzelos & Gregor, 1990; Velitzelos et al., 2014); *P. schimperi* dal Paleocene di Francia e Inghilterra (Kvacek, 2010); *P. leucophylla* dal Miocene superiore e dal Pliocene d' Italia (Martinetto et al., 2007; Bertini & Martinetto, 2008) e in Grecia (Velitzelos et al., 2014); e *P. academiae* dal Miocene superiore e dal Pliocene di Grecia (Velitzelos et al., 2014). Nel Pleistocene, una volta che i cicli glaciali/interglaciali si affermano, taxa termofili, molto sensibili a diminuzioni improvvise della temperatura, appaiono solo nell' interglaciale caldo e nei periodi interstadiali, mostrando una registrazione discontinua nell'Europa centrale. Nell'Europa mediterranea, vari taxa termofili ancora sono presenti nel Pleistocene superiore. Nella penisola Iberica (Postigo Mijarra et al., 2007, 2008, 2010), per esempio, è stato trovato un importante gruppo di taxa tra cui *Castanea*, *Carpinus*, *Celtis*, *Fagus*, *Juglans* e *Platanus*, persistente per tutto il Quaternario, resistendo al freddo e ai climi asciutti del Pleistocene Medio e Inferiore. Il polline di *Platanus*, in particolare, è scomparso solo in tempi molto recenti raggiungendo, in via residuale, l'Olocene. In Francia, polline di platano è stato trovato solo sporadicamente in piccole quantità in entrambi i sedimenti del Pliocene o Pleistocene superiore (Gauthier, 1992; Argant, 2004). Sono stati trovati granuli sporadici di platano anche in tre nuclei marini nei sedimenti del Pleistocene superiore e la prima parte dell'Olocene del Golfo di Lione (Beaudouin et al., 2005). In Grecia, la presenza di platano si riscontra dall' Oligocene con *Platanus neptuni* a Evros (NE Grecia Velitzelos, Kvacek, et al., 2002). Alcune specie di *Platanus* risalenti al Miocene superiore sono state trovate in

Macedonia/Tracia (N Grecia) e sull'isola di Corfù. *Platanus* è stato trovato anche in diversi siti di età Pliocenica (Velitzelos & Gregor, 1990). La sua presenza è stata confermata dal ritrovamento, sull'isola di Rodi, di macrofossili del Pleistocene attribuiti a *Platanus lineariloba* (syn. *P. Academiae*, Velitzelos, Teodoridis et al., 2002, 2014) e polline del Pleistocene medio nei reperti di polline di Tsampika (Kouli, pers. comm., Rosati et al., 2015). In Italia foglie di *Platanus leucophylla* (Unger) Knobloch, si ritrovano frequentemente nelle evaporiti del Messiniano (Martinetto et al., 2007; Bertini & Martinetto, 2008). Questo taxon è sempre accompagnato dalle stesse decidue (ad esempio *Acer*, *Alnus*, *Fagus*, *Liquidambar*, *Populus*, *Pterocarya*, *Quercus*, *Salix* e *Zelkova*) e sempreverdi (ad esempio Lauraceae, *Engelhardia*, *Smilax* e *Trigonobalanopsis*) taxa di latifoglie associate a diverse conifere (*Tetraclinis*, *Taxodium*, *Sequoia* e *Pinus*). Per quanto riguarda l'età del Messiniano, polline attribuito a *Platanus* è stato spesso trovato nei sedimenti italiani (Ghetti et al 2002; Bertini, 2006). È stato anche frequente nei sedimenti Pliocenici, per esempio, a Stirone nell' Appennino settentrionale (Bertini, 2001), presso il Poggio Rosso nel bacino del Valdarno Superiore (Bertini et al., 2010) e al Fosso Bianco nel bacino Tiberino (Pontini e Bertini, 2000). Sorprendentemente, fossili di *Platanus* nel Pleistocene sono molto rari. Nessuna traccia di polline di platano è stato ritrovato nelle sequenze Pleistoceniche del centro Italia, mentre nel sud Italia la presenza di polline di platano sembra essere stato riportato solo nei siti del Pleistocene inferiore di Saticula (Sant'Agata de Goti, Benevento; Russo Ermolli et al., 2010) e nella sezione di Semaforo (Crotone; Combourieu-Nebout, 1995). Il polline di platano non appare nelle sequenze polliniche del Pleistocene medio dell'Italia, anche nelle sequenze delle regioni in cui attualmente vivono i platani. Per il Pleistocene superiore, la sua presenza è indicata da Renault-Miskovsky et al. (1984) nel Nord Italia (Liguria e Veneto). Grani di polline di *Platanus* non sono mai stati registrati nei reperti dell'Olocene della Basilicata (Mercuri et al., 2010; Florenzano e Mercuri, 2012), Calabria (Canolo

Nuovo: Schneider, 1985; Lago di Trifoglietti: Joannin et al., 2012) e Sicilia (Lago Preola: Calò et al., 2012; Gorgo Basso: Tinner et al., 2009; Lago di Pergusa: Sadori e Narcisi, 2001; Sadori et al., 2008, 2013; Biviere di Gela: Noti et al., 2009). L'origine di alcuni reperti sporadici nei siti dell'età Media del Bronzo nel Nord Italia è sotto inchiesta perché la presenza di polline di platano può essere attribuito al trasporto a lunga distanza (Mercuri in verbis, Rosati et al., 2015). Gli unici ritrovamenti recenti sono di epoca romana, con ritrovamenti in Campania concentrati nell'area di Napoli. Molti siti storici mostrano la presenza sporadica ma piuttosto continua di *Platanus*. Al porto greco-romano di Neapolis (Russo Ermolli et al., 2014), raro polline di platano è stato trovato e datato al 1° secolo BC. I sedimenti del Lago d'Averno registrano un importante ampliamento del platano in età romana, presente, anche se sporadicamente, fino all' 8° secolo AD (Gruger & Thulin, 1998; Gruger et al., 2002). Tutti gli altri reperti sono stati ritrovati nella zona vesuviana, dai siti distrutti dall'eruzione del 79 d.C. Carboncini di *P. orientalis* sono stati recentemente trovati da Moser et al. (2013) nel terreno del giardino nord della Villa di Poppea ad Oplontis dove, in precedenza, Jashemski (1979) aveva trovato cavità profonde; mentre il polline è stato spesso trovato nei giardini delle ville romane vesuviane (Mariotti Lippi & Mori Secci, 1997; Mariotti Lippi, 2000; Mariotti Lippi e Bellini, 2006). I dati disponibili provenienti da siti che coprono l'età romana, in luoghi situati a nord di Napoli, non hanno segnalato resti del platano (es Mercuri et al., 2002, 2013). In particolare, i porti romani di Roma e Pisa, indagati da un punto di vista archeobotanico, non hanno fornito alcuna traccia di *Platanus* (Mariotti Lippi et al., 2007; Sadori et al., 2010, 2014; Pepe et al., 2013; Goiran et al., 2014). Sulla base di tutti questi reperti appena descritti è chiaro che i platanoidi erano abbondanti, altamente polimorfici, e spesso membri dominanti di un'ampia vegetazione di tipo ripariale diffusa in tutto l' Emisfero settentrionale. Risulta comunque molto difficile posizionare i fossili, tra le specie moderne di *Platanus*, a causa del basso livello di diversità morfologica all'interno delle specie

esistenti; l'età di particolari fossili e la loro distribuzione può aiutare sia nella stima dei tempi di divergenza sia nell'interpretazione del ruolo delle aree mancanti.

MITI E LEGGENDE LEGATE AL PLATANO

Nell'area mediterranea, la presenza di *P. orientalis* è legata non solo ai temi ecologici e fitogeografici ma anche ad un antico interesse umano, come attestano classiche fonti storiche della letteratura greca e romana. Autori greci spesso parlano del platano come un albero sacro per la sua piacevole ombra. È interessante notare che, Plinio il Vecchio ha riferito che il platano è stato introdotto in Italia da un paese straniero solo per la sua ombra: l'albero sarebbe arrivato attraverso il Mar Ionio, intorno al 390 a.C., in un primo momento nelle isole Tremiti presso la tomba di Diomede, poi importato in Sicilia da Dionisio il Vecchio (432-367 a.C.), tiranno di Siracusa (*Naturalis Historia* 12, 3-7) e nella città di Rhegion (Reggio di Calabria, Italia). Dell'importanza del platano nel bacino del Mediterraneo è data conferma, per esempio, dal toponimo Teheran che significa "luogo dove crescono i platani". In tutto l'Oriente è considerata una pianta sacra, simbolo di Dio e pertanto piantata vicino ai templi e alle fonti. In Grecia, il platano era venerato come pianta sacra alla Madre Terra poichè la forma delle foglie ricorda il palmo aperto di una mano che benedice; i 5 lobi della foglia che rassomigliavano alle cinque dita della mano aperta rappresentavano un gesto di benedizione della dea, che si ritrova spesso nelle statuette cretesi. Un'altra leggenda racconta che nel Paradiso Terrestre, il Serpente, dopo aver tentato Eva, per timore di una vendetta del Signore, si nascose nella cavità di un grande Platano, che allora aveva la corteccia liscia e argentea. Quando Dio passò di albero in albero alla ricerca del Serpente, il Platano, sedotto dal Diavolo, non rivelò di ospitarlo fra le sue fronde. Ma il Signore Onnipotente non si lasciò ingannare e maledisse il Platano, facendo diventare la sua corteccia squamosa come la pelle del Serpente e costringendolo a mutarla come il rettile che

aveva protetto. Questa pianta è presente anche nel mito di Ercole, il quale narra di come uccise un mostro (l'Idra di Lerna, la seconda delle sette fatiche) proprio sotto un platano; inoltre il platano fu scelto da Giove per festeggiare lo sposalizio con Giunone ed infine Socrate impartiva le sue lezioni sotto un platano. Il platano orientale è sacro nella provincia della Lidia (Asia Minore). Pizio nipote del leggendario Creso offrì a Dario re di Persia un platano d'oro. Serse, figlio di Dario, nel 480 a.C. durante la spedizione contro la Grecia, passò per la Lidia dove trovò "un platano così bello che lo adornò con oro e lo fece sorvegliare giorno e notte da uno dei suoi immortali guardiani del corpo reale". Nel Peloponneso era dedicato a Elena, semidea, figlia di Zeus e di Leda, moglie di Menelao re di Lacedomane. Menelao prima di partire per la guerra di Troia piantò un platano presso la fonte sacra di Castalia. Mentre Agamennone offriva un sacrificio propiziatorio agli dei, "un serpente azzurro, col dorso coperto di macchie rosso sangue, spuntò da dietro l'altare e si diresse su un bel platano lì vicino, strisciò verso l'alto e ingoiò in un attimo otto piccoli uccellini e la loro madre che si trovavano nel nido. Zeus adirato mutò il serpente in pietra". L'indovino Calcante interpretò così l'accaduto: nove anni dovevano trascorrere prima che Troia venisse presa, ma dal decimo anno avrebbe capitolato. Che il platano ricorre più volte nella guerra di Troia è confermato dall'episodio del suicidio di Elena, che si impiccò ad un platano nell'isola di Rodi. All'epoca di Pausania (secolo II d.C.) si mostravano ancora i due platani di Cafie e dei Delfi datati più di mille anni. Nel 1° secolo d.C. un platano di Licia avrebbe ospitato all'interno del suo tronco cavo un pranzo con 18 coperti; i commensali invitati dal console M. Licinio Crasso Muciano, "stavano adagiati su giacigli di foglie dell'albero stesso". Caligola volle fare la stessa cosa in Italia a Velitre (Velletri); fece montare una tenda su un platano per 15 commensali e i rami dell'albero fungevano da sedili. Il platano più famoso è quello della città di Cos, nell'isola omonima, al largo della costa turca. I suoi rami sorretti da antiche colonne coprono la piazza; il tronco è largo 14 metri. Alla sua ombra

Ippocrate 2500 anni fa, riceveva i pazienti. I Romani sostenevano che questo albero tenesse lontano i pipistrelli, considerati volatili di malaugurio, e che il suo fiore, preso con il vino, fosse un antidoto contro il veleno dei serpenti. Nel 400 a.C. fu introdotto in Italia, dove fu pianta molto venerata: si narra che un senatore romano, per rispetto verso la pianta, annaffiasse i suoi platani con il vino e che questo gli procurasse una sorprendente vegetazione. Anche Plinio il Vecchio testimonia, con i suoi scritti, la diffusione del platano nella Gallia ad opera dei Romani. Dopo un periodo buio coincidente con il Medio Evo in cui non se ne parlò più, il platano ebbe nuova diffusione nel Rinascimento, quando l'Italia divenne riferimento artistico per tutto il continente e condizionò, quindi, anche l'arte dei giardini determinandone la diffusione anche in Gran Bretagna. Nel 1750 la pianta si diffuse in maniera capillare in tutta la Francia per opera di Luigi XV e alla passione di Napoleone per il platano e i viali alberati è legata la sua nuova diffusione in tutti i paesi interessati dalle campagne di guerra.

Platanus orientalis

Il nome generico deriva dal greco *platanos* derivato da '*platus*' (largo e piatto), che ricorda la



parte piatta della mano, il palmo, in riferimento alla forma ampia delle foglie e della chioma; il nome specifico allude alla sua naturale distribuzione nel bacino del mediterraneo orientale. Questo albero, deve la sua enorme circonferenza alla fusione di numerosi fusti ma rispetto alla maggior parte degli alberi a foglie caduche, *P. orientalis* è sicuramente più longevo e raggiunge dimensioni maestose, sia nella dimensione della sua fitta e molto

ombrosa chioma sia nella circonferenza del suo tronco, che spesso supera i nove metri, inoltre può arrivare ad essere alto fino a una quarantina di metri.

Il platano orientale è un albero longevo e resistente, a crescita rapida, che preferisce terreni argillosi e umidi. La sua corteccia bianco-grigiastro, si sfalda con l'età in placche irregolari dai bordi tondeggianti che evidenziano la nuova corteccia più chiara, verdognola. Le grandi foglie dagli 11 ai 18 cm di larghezza per 12-24 cm di lunghezza si alternano dalla lamina con 5 lobi palmati appuntiti, ma se ne possono trovare dai 3 fino a 7 e si irradiano da un lobo centrale di circa 7-11 cm e largo dai 2.5 ai 6 cm (Pignatti, 2003, Fig. 11; Yaltirik, 1983). Le foglie sono munite di un picciolo lungo e allargato alla base che coinvolge la gemma ascellare alla base del quale partono le nervature, che sono palminervie e costituite da una parte centrale e due laterali, che a loro volta si dividono in nervature secondarie. Quando si sviluppano, inizialmente, le foglie sono tomentose, formate da peli stellati di un biancastro-marrone che poi scompaiono, lasciando le foglie vellutate nella parte superiore, mentre sono glabre nella parte inferiore e presentano solitamente dai 2 ai 4 denti acuti sul margine; in autunno, prima di cadere, assumono un caldo colore giallo sfumato d'ocra. Le stipule latifoglie circondano i rami che si distendono a formare un'ampia e densa corona cupiliforme. Il *Platanus orientalis* è una specie monoica con fiori attinomorfi e unisessuali riuniti in capolini globosi e penduli, del diametro di 2-3 cm, portati da un lungo peduncolo a gruppi di 2-5. I fiori sono riuniti in infiorescenze pendule sferiche; così come le infruttescenze che sono dotate di lunghi peli, che si disperdono nell'aria quando giunge la primavera. I fiori maschili sono per lo più tetrameri o esameri (4-6 stami) con perianzio (calice e corolla) ridotto a brevi squame e sono di colore rossastro mentre i fiori femminili con perianzio ridotto, sono trimeri con 3-6 carpelli liberi, ognuno recante 1-2 ovuli penduli ortotropi. Il pistillo varia in numero da cinque a nove per fiori ed è costituito da un semplice carpello. Questo è lungo e sottile e non è completamente chiuso, essendo aperto nella parte superiore delle ovaie (Boothroyd, 1930). Inoltre sono ipogini ed hanno una stimma lineare sul lato interno dello stilo e sono di color verde giallastro. I capolini

femminili si trasformano in frutti composti chiamati achenosi, hanno una forma sferica, di colore bruno, composti da piccoli acheni pelosi (nucule) che ne facilitano la dispersione anemofila. I capolini restano sulla pianta fino all'infiorescenza successiva per poi liberare i piccoli frutti chiamati acheni. Il *Platanus orientalis* è una fanerofita scaposa con fioritura da marzo a maggio. Il seme viene trasportato dal vento grazie alla sua portanza aerodinamica e alla capacità di galleggiamento (in aria e acqua) conferita all'achenio dai peli basali. I semi possono germinare già l'inverno successivo alla loro produzione e la loro vitalità, in opportune condizioni, può durare alcuni anni. La capacità germinativa è del 30-40% (Piotto, Di Noi, 2003). Il polline è tricolporato, ovvero provvisto di tre aperture composte rappresentate ciascuna da un solco ed un poro, e prolato con granuli non sferoidali e allungati ai poli (Denk & Tekleva, 2006).

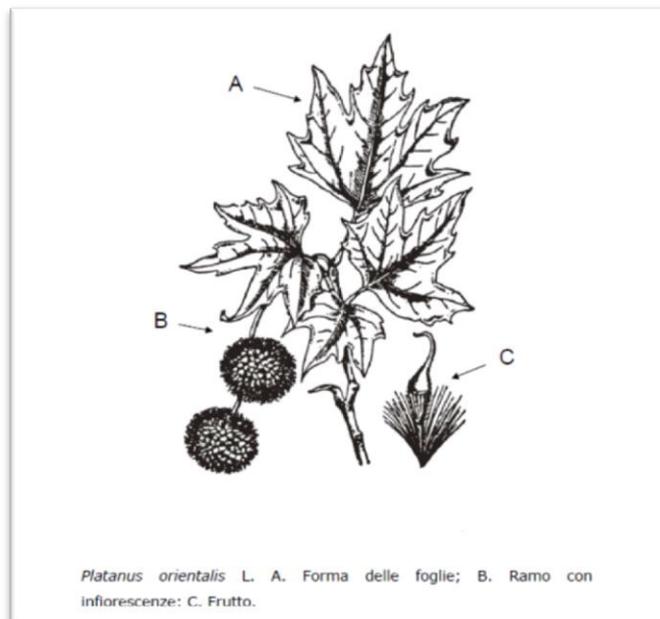


Figura 11 Descrizione di *Platanus orientalis* (Pignatti, 2003).

Platanus orientalis costituisce un interessante elemento floristico nelle foreste ripariali (ripisilve), formazioni a prevalente componente arborea ed arbustiva strettamente legate alla

presenza di corsi d'acqua permanenti o temporanei (Quezel et Medail, 2003), in un ampio areale di distribuzione e in una fascia altitudinale che va dal livello del mare sino a 1300 m s.l.m. Le associazioni vegetali che questa specie costituisce appartengono all'alleanza *Platanion orientalis* I. Kárpáti & V. Kárpáti, 1961 e, pur ricadendo in tipologie tipicamente azionali (indipendenti dalla fascia altitudinale e dalla regione in cui vengono a insediarsi), assumono aspetti peculiari nel vasto areale di distribuzione della specie. Queste formazioni hanno una particolare rilevanza fitogeografica nel Mediterraneo orientale in quanto rappresentano le comunità vegetali in cui hanno trovato rifugio alcuni elementi mesotermi come *Platanus* e *Liquidambar*, che in questo modo hanno potuto sopravvivere alle glaciazioni (Quezel and Medail, 2003). Per l'elevato interesse ecologico e conservazionistico sono incluse nell'Habitat 92C0 nella Direttiva 92/43/CEE.

In queste comunità sono presenti altre specie tipiche dei boschi ripariali, come *Salix alba* L., *Salix elaeagnos* Scop., *Salix purpurea* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., cui si accompagnano talora *Populus nigra* L. e *Populus alba* L.. Nel sottobosco si rinvencono frequentemente *Nerium oleander* L., *Rubus* sp. pl., *Tamarix gallica* L., *Laurus nobilis* L., *Vitis vinifera* L., *Hedera helix* L., *Carex pendula* Huds., *Solanum dulcamara* L., *Carex remota* L., *Equisetum telmateja* Ehrh., *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N.Robson, *Daucus carota* L., *Melissa officinalis* L., *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P.Beauv., *Dactylis glomerata* L. (European Commission, 2013; Biondi e Blasi, 2015).

Esso si estende in un'area che va dalla regione mediterranea orientale sino ad Est dell'Himalaya e non pochi studiosi lo ritengono indigeno anche in Sicilia, Calabria e Cilento, dove cresce spontaneamente in formazioni boschive umide, in terreni alluvionali ricchi di pietre e sulle rive dei fiumi e tende a costituire formazioni ripariali piuttosto stabili ad altitudini comprese tra 0 e 900 m s.l.m., nella fascia termomediterranea e in quella mesomediterranea, lungo corsi d'acqua

perenni, in particolare nei tratti che scorrono in valli strette o incassate interessate da peculiari condizioni microclimatiche calde e umide. Queste comunità si insediano su suoli alluvionali a tessitura sabbiosa o ciottolosa, nei tratti inondati saltuariamente dalle piene invernali e generalmente con disponibilità idrica anche durante i mesi estivi (Biondi et al., 2009). La specie occupa in Italia la porzione più occidentale dell'areale naturale; si tratta di subpopolazioni disgiunte, rispetto a quelle più vicine della Penisola balcanica. Il Platano in Italia partecipa solamente alle ripisilve e pertanto risulta fortemente legato all' ambiente ripariale; per questo motivo le forme di degradazione spesso determinano la sostituzione con arbusteti più o meno strutturati con *Salix alba* (*Salicion albae* Soò, 1930). Il cattivo stato di conservazione di queste formazioni, sempre inserite in contesti fortemente antropizzati, ha portato ad ipotizzare una possibile origine alloctona delle specie (Rosati et al., 2015) già proposta nella letteratura più antica (Targioni - Tozzetti, 1853; Saccardo, 1909). Questa supposizione è basata dagli autori (Rosati et al., 2015) su dati paleobotanici che indicano che diverse specie di *Platanus* erano presenti in Europa, relativamente diffusi nei reperti del Pliocene e Pleistocene dell'Europa centrale, Grecia, Francia e Italia. Queste popolazioni sono state persistenti in Spagna e Francia fino agli inizi dell'Olocene. Reperti di polline del Vicino Oriente e nelle regioni dei Balcani mostrano, invece, negli ultimi tempi, una diffusione di *Platanus* dal Vicino Oriente alla Grecia. Infatti, nell'antico lago Hula (Israele), polline di *Platanus* si osserva durante l'ultimo periodo glaciale, risalente a 20.000 anni BP (van Zeist et al., 2009). Al lago di Van, in Turchia, le tracce di platani si trovano risalenti a circa 12500 anni BP (Wick et al., 2003), mentre i più antichi macroresti, risalenti a circa 9300 cal. BP, provengono dal sito neolitico di Catalhoyuk Orientale (Asouti e Hather, 2001). In Grecia, dopo essere scomparso per centinaia di migliaia di anni prima del Pleistocene medio, il polline di platano è presente nei diagrammi pollinici da circa 8000 BP, diventando molto comune da circa 4500 BP. La diffusione nel tardo Olocene di

Platanus in Grecia e nelle sue isole è stata interpretata come un effetto dell'azione umana (Bottema e Sarpaky, 2003), che è in accordo con le fonti di letteratura classica. I dati paleobotanici mostrano la presenza comune di *Platanus* nel Sud Italia solo a partire dal periodo romano, confermando la sua introduzione per uso ornamentale, come riportato da Plinio il Vecchio, suggerita anche da rappresentazioni di dipinti murali e mosaici (Jashemski et al., 2002), da impronte di foglie (in Stabiae, Jashemski, 1979), di polline (area vesuviana, per esempio Mariotti Lippi e Bellini, 2006) e carboncini e cavità radicali (Oplontis, Moser et al., 2013). Inoltre, la coincidenza impressionante tra gli attuali siti di distribuzione di platani e le posizioni di alcune città della Magna Grecia (ad esempio Elea-Velia in Campania, Megara Hiblea, Siracusa, Naxos in Sicilia, Crotone, Scolacium, Caulonia in Calabria; Fig. 12) suggerisce una introduzione in questi siti, risalente alla colonizzazione greca del Sud Italia (Rosati et al., 2015).

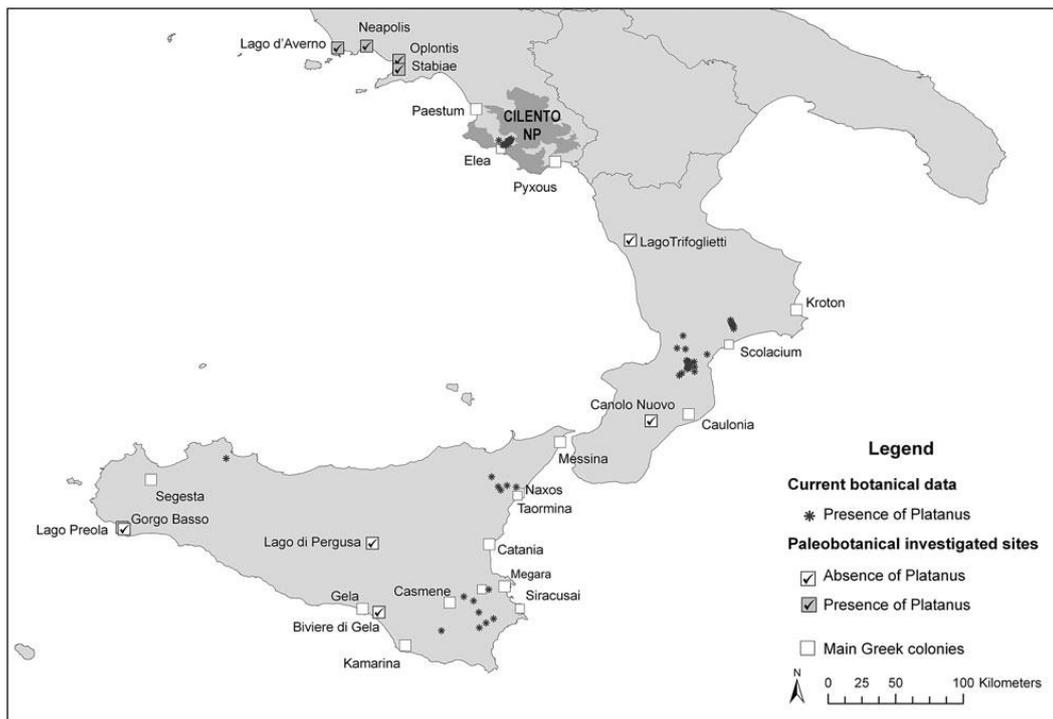


Figura 12 Distribuzione attuale di *P. orientalis* in Italia e la sua presenza/assenza in reperti paleobotanici (pollini e macroresti). In figura sono mostrate le principali colonie greche (Rosati et al., 2015).

Nel Cilento, l'attuale presenza di *P. orientalis* è limitata a due fiumi, Badolato e Palistro, vicino alle colonie greche di Elea-Velia, che era la sede della scuola presocratica di filosofi fondata da

Parmenide. Il genere *Platanus*, essendo impollinato e disperso dal vento, è conforme con il presupposto per la valutazione di uno stato nativo o introdotto di una specie, cioè produce fossili sufficienti e identificabili (come il polline e i frutti; van Leeuwen et al., 2005). Tuttavia, va notato che tutti i siti del sud Italia, dove sono disponibili indagini palinologiche, sono lontani dalle zone in cui è presente *Platanus* oggi e che non coincidono con insediamenti romani e/o greci. L'assenza di polline di platano potrebbe indicare che questo polline è raro, ma non certamente assente, perché la presenza sporadica di solito non è riportata nei diagrammi pollinici. Tuttavia, la scarsa presenza di polline può essere attribuibile a qualche trasporto a lunga distanza e non per la presenza locale di piante (Mercuri, in corso di stampa). Nel territorio italiano, *P. orientalis*, come mostrato nei dati paleobotanici e nelle fonti storiche, potrebbe essere considerato un archeofita non invasivo, in opposizione a recenti valutazioni nazionali (Celesti et al., 2009; Rossi et al., 2014).

Le principali sub-popolazioni della specie si trovano nella regione mediterranea, la sub popolazione campana di *P. orientalis* è concentrata nella provincia di Salerno (Tenore, 1831-1842; Parlatore, 1867; Bèguinot, 1925; Moggi, 2001; Corbetta et al., 2004), dove sono state individuate 15 stazioni, con formazioni che sono state inquadrare (Corbetta et al., 2004) nei Petasiti ibridi-*Platanetum orientalis* I. et V. Karpati 1961. Lungo il Torrente Fiumara sono presenti 4 stazioni, 3 delle quali ricadenti nel territorio del comune di Sessa nel Cilento ed una nel comune di Casalvelino; lungo il Torrente Badolato sono presenti 4 stazioni ricadenti nei comuni di Castelnuovo Cilento, Ceraso e Vallo della Lucania. Altre 4 stazioni sono presenti sui torrenti Palistro e Alento, nei comuni di Ceraso e Ascea nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. Le restanti 3 stazioni campane si trovano sul Torrente Fiumarella, tutte comprese nel comune di Ascea e ricadenti nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. Le stazioni campane sono da considerarsi di probabile origine naturale, seppur fortemente frammentate e

compromesse dalle attività antropiche. In Calabria *P.orientalis* è distribuito nella parte centrale della regione in sei località concentrate tutte nella provincia di Catanzaro (S. Vito sullo Ionio, Curinga, Cortale, Melissaro, Nicastro e Filadelfia) e 28 stazioni tutte ricadenti vicino ai bacini dei fiumi Beltrame, Uria, Alessi e Ancinale (Caruso et al., 2008). Le formazioni riparie all' interno di canyons (cave) della Sicilia orientale nell' area degli Iblei e del fiume Oreto sono riferite al *Platano-Salicetum pedicellatae* (Barbagallo, Brullo et Fagotto, 1979) per la presenza di *Salix pedicellata* Desf., mentre più a Nord, nell' area che comprende il settore meridionale dei Peloritani e le porzioni basali dell'Etna, sono riferite al *Platano-Salicetum gussonei* (Brullo et Spampinato, 1990), caratterizzato dalla presenza di *Salix gussonei* (Brullo & Spampinato, 1990; Gianguzzi et al., 2016). In Sicilia, appunto, la specie è stata censita in 22 stazioni, distribuite in tre distinti sub-areali. Il primo, relativamente esteso, è ubicato tra il versante meridionale dei Monti Peloritani e la parte bassa dell'area etnea; il secondo, anch'esso piuttosto vasto, si localizza lungo le incisioni torrentizie degli Iblei ("cave") (Gianguzzi et al., 1995); il terzo, più occidentale, è circoscritto ad una ristretta area presso Palermo. A cavallo delle province di Messina e Catania si trova la stazione del Fiume Alcantara; nonostante il generalizzato persistere di diversi fattori di minaccia, la specie in Sicilia trova la sua massima espressione, in termini quantitativi e qualitativi. Viceversa in Calabria, e soprattutto in Campania, la distribuzione della specie risulta fortemente frammentata ed inserita in contesti così antropizzati da rendere improbabile un recupero della specie nel breve periodo (Caruso et al., 2008). Oltre che in Italia il taxon è presente nella Penisola Balcanica, in Grecia, in Turchia ed in Bulgaria (Tutin & Edmondson, 1993). A differenza delle altre specie ripariali la specie bulgara è più tollerante alle condizioni del suolo riuscendo a crescere su strati di terreno molto limitati e sulla ghiaia lungo i fiumi. In Bulgaria sono state individuate 9 stazioni che rappresentano l'intera area di distribuzione: Kresna (KR) Sandanski (SA) Slavyanka (SL) Petrich (PE) Melnik (ME) Goce

Delchev (GD) Assenovgrad (AS) Topolovo (TO) Ivaylovgrad (IV) (Grueva & Zhelev, 2011). Per quanto riguarda i popolamenti greci, dalla letteratura non è facile evincere precisamente i luoghi di stazionamento, è però stato osservato che esso cresce prevalentemente lungo corsi d'acqua, precisamente lungo i fiumi Acherontes, Aeos e Nestos. In Albania invece sono riportati popolamenti lungo i corsi d'acqua Drino e Osum. In Grecia e nei Balcani meridionali *P. orientalis* è presente in due differenti ambienti: nelle formazioni riparie dei principali sistemi fluviali, su depositi alluvionali poveri e spesso effimeri perché interessati dalle piene stagionali, e su versanti costituiti da materiale di disfacimento dei rilievi montuosi, su suoli molto poveri ed instabili. Pur essendo presente in formazioni forestali in un range altimetrico dai 250 ai 1300 metri, questa specie diventa dominante nella porzione media del corso del fiume tra i 300 e gli 800 metri, mentre compare con individui sparsi e con coperture inferiori nelle porzioni superiori ed inferiori (Panagiotas et al., 2008; Zogaris et al., 2008); il Platano si associa con altre specie delle formazioni ripariali come *Salix eleagnos* a quote superiori e *Salix alba* a quote inferiori. In particolare le associazioni descritte per il territorio albanese sono *Juglando-Platanetum orientalis* Em et Dekov, 1961, *Nerio-Platanetum orientalis*, Karpati, 1962 *Petasiti-Platanetum orientalis*, Karpati, 1962, *Platanetium orientalis balcanicum*, Karpati, 1962 (Dring et al., 2002), in cui prevalgono componenti tipicamente orientali della flora mediterranea come *Juglans regia* L., *Cercis siliquastrum* L., *Celtis australis* L., *Vitex agnus-castus* L.. Relativamente alle aree del Caucaso e dell'Asia le informazioni di tipo ecologico sulle comunità vegetali sono molto frammentate e spesso si riducono a semplici descrizioni della presenza di questa specie e del suo elevato valore conservazionistico *P. orientalis* partecipa sempre a comunità ripariali in associazione con le altre specie tipiche di questa tipologia di boschi, accompagnate da altre specie della flora Euro-Siberiana ed Irano-Turaniana. In Asia Minore e nell'isola di Rodi le formazioni a *P. orientalis* si arricchiscono in particolare della presenza di *Liquidambar orientalis*

Mill., la cui presenza prevalente ha portato a descrivere per la Turchia l'associazione *Quercus ilicis-Liquidambarum orientalis* Celik et al. (Öztürk et al., 2008). A Cipro, in Siria ed in Libano si associa invece prevalentemente con *Alnus orientalis* Decne (Yon and Tendron, 1981; Nahal et Rahme, 1990).

Come già detto soprattutto in Italia il platano orientale è considerato come una specie di particolare interesse a causa del rischio di estinzione. Insediamenti preesistenti e talvolta recenti costituiscono una minaccia per la diretta perdita di habitat della specie. L'inclusione delle formazioni a *P. orientalis* nella Direttiva 92/43/CEE in qualità di habitat di interesse conservazionistico (92C0) permette oggi di verificare il loro stato di conservazione all'interno degli stati membri della Comunità Europea. Sulla base dei dati recentemente presentati nell'ambito dell'ultimo ciclo di Reporting ex art. 17 <http://art17.eionet.europa.eu/article17/reports2012/> è possibile verificare che lo stato di conservazione dell'habitat risulta sfavorevole in Bulgaria ed in Italia a causa dei numerosi fattori di rischio che agiscono nelle rare località in cui l'habitat è presente, provocando un notevole impoverimento delle comunità che lo costituiscono. Questi fattori di rischio, registrati anche in Grecia e a Cipro, hanno un impatto meno evidente sulla valutazione complessiva dello stato di conservazione dell'habitat grazie alla sua maggiore diffusione in queste regioni. Gli ecosistemi fluviali, estremamente fragili per loro natura perché sottoposti a processi erosionali e deposizionali a volte molto violenti, risentono inoltre di numerosi fattori di disturbo antropici che incidono notevolmente sulle formazioni vegetali aumentandone la vulnerabilità e frammentazione. Diverse sono le minacce che potrebbero portare all'estinzione come: l'aumento della presenza umana legata agli insediamenti che determinano indirettamente condizioni non adatte allo sviluppo della specie; le coltivazioni agricole che in diverse stazioni italiane di *P. orientalis*, arrivano nelle immediate vicinanze dei corsi d'acqua, spesso a scapito

delle stesse fasce di vegetazione ripariale. L'agricoltura intensiva esercita anche altre azioni negative sui popolamenti, causati ad esempio dall'immissione di reflui nei corsi d'acqua e soprattutto attraverso la captazione di acqua a scopo irriguo. L'allevamento di bestiame nei pressi dei sistemi fluviali costituisce un problema per il rinnovo di *P. orientalis*, le cui plantule e giovani individui vengono precocemente distrutti dal consumo e dal calpestio da parte del bestiame e le foglie tenere vengono a loro volta consumate dal bestiame. Gli ambienti fluviali presenti nell'area studiata sono soggetti a pressioni antropiche di varia natura. La manomissione delle aste fluviali e la rimozione meccanica della vegetazione arborea ripariale, soprattutto nei tratti terminali dei corsi d'acqua, sono comunemente considerate come un efficace sistema per ridurre i rischi di esondazione. Tali reiterate pratiche di "pulitura dell'alveo", dalla dubbia efficacia, comportano il più delle volte una destabilizzazione delle formazioni glareicole e ripariali, ivi inclusi gli stessi nuclei residuali di *P. orientalis*, riducendone di fatto l'areale potenziale (Caruso et al., 2012). In Calabria, in particolare sul Torrente Uria, sono state osservate plantule e giovani individui di *P. orientalis* alcuni chilometri a valle dei più vicini esemplari adulti. Ciò indica un più ampio areale potenziale per la specie, la quale tuttavia non realizza formazioni stabili a causa della continua azione dei mezzi meccanici. Le acque fluviali e dei torrenti in cui vegeta la specie sono spesso imbrigliate da dighe o regimentate per produrre energia idroelettrica. A parte i danni dovuti a tali infrastrutture ubicate sulle rive, dove sottraggono spazi potenziali all'insediamento della specie, i maggiori effetti negativi sono imputabili all'alterazione artificiale della portata dei corsi d'acqua ed alla conseguente riduzione delle falde. Inoltre la specie, studiata nell'areale italiano, si trova spesso a competere con specie arboree aliene invasive e tra le numerose avversità animali e fungine cui è soggetto *P. orientalis*, alcune sono causate da specie aliene, tra queste la più temuta è indubbiamente *Ceratocystis platani*, ascomicete responsabile di una fatale tracheomicosi, nota come "Cancro

colorato del Platano". Una volta penetrato nella pianta attraverso ferite, discontinuità nei tessuti di rivestimento (Panconesi, 1999) e anastomosi radicali (Accordi, 1986), il patogeno porta a rapida morte gli individui attaccati. Sebbene non sia noto alcuno specifico fenomeno riguardante le popolazioni native italiane, considerata l'interfertilità delle specie di *Platanus* e la presenza sul nostro territorio di taxa esotici appartenenti al medesimo genere è ipotizzabile il rischio di ibridazione delle nostre popolazioni naturali. Oltre la naturale frammentazione della popolazione italiana derivante essenzialmente dall'ecologia della specie e dalla geo-morfologia del territorio, la pressione antropica ha determinato in molti casi un'ulteriore rarefazione delle subpopolazioni di *P. orientalis*. Tale fenomeno, come già accennato, assume dimensioni preoccupanti, in particolare in Campania e Calabria, ma non è del tutto assente neanche in Sicilia. Si prevede per il futuro, una riduzione della qualità ed estensione degli habitat legata all'uso antropico degli ambienti fluviali in cui la specie si rinviene. Considerata l'ecologia della specie, risulta difficile ipotizzare interazioni delle nostre popolazioni con quelle appartenenti ad altre parti dell'areale globale che possano suggerire variazioni del livello di rischio assegnato alla popolazione italiana.

PRINCIPALI FATTORI CHE INFLUENZANO LA DIVERSITA' GENETICA DELLE POPOLAZIONI RELITTE DI *Platanus orientalis* E SCOPO DELLA TESI

L'attuale distribuzione della flora arborea in Europa, come già evidenziato, è il risultato dei fenomeni di contrazione e successiva migrazione subita dai taxa nelle diverse fasi del Quaternario. Le specie vegetali hanno risposto ai cambiamenti climatici limitando la loro distribuzione, durante le fasi fredde, ad aree di rifugio in cui le condizioni ambientali garantivano loro la sopravvivenza, e dando luogo a nuove espansioni all'inizio di ogni fase temperata (Bennet et al., 1991; Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998). Questo processo si è

verificato anche alla fine dell'ultimo periodo glaciale (circa 13000 anni bp). Occorre precisare però che nell'ultimo interglaciale all'influenza dei fattori ambientali si è sommata quella dei fattori umani. Nelle ultime migliaia di anni l'impatto antropico sull'ambiente e in particolare su quello mediterraneo è stato fortemente incisivo. Lo sviluppo dell'agricoltura ha contribuito alla modifica del paesaggio vegetale portando alla diffusione sempre maggiore di forme coltivate di specie selvatiche e in tempi più recenti, all'introduzione di specie non autoctone. Contestualmente allo sviluppo agricolo che ha portato all'aumento significativo della popolazione umana grazie a migliori condizioni di vita, l'ambiente naturale, in particolare quello forestale, ha subito profonde modifiche e limitazioni. L'impatto antropico sull'ambiente forestale mediterraneo ha causato la lenta sostituzione, dell'originaria vegetazione di foreste decidue, con le sclerofille sempreverdi tipiche della macchia mediterranea. In queste condizioni, accanto a specie caratteristiche della macchia mediterranea, alcuni relitti della vegetazione primitiva sono sopravvissuti in situazioni di nicchia grazie a particolari circostanze microambientali. Negli ultimi anni la comunità scientifica ha impiegato notevoli risorse per comprendere le conseguenze del cambiamento climatico sull'ecosistema mediterraneo con particolare interesse alle foreste europee (Streiff R. et al., 1999 e Ohsawa T. et al., 2007) e nello specifico a popolazioni arboree relitte. Per queste specie relitte, le informazioni sulla distribuzione della loro diversità genetica e sulla struttura genetica delle popolazioni rappresentano un aspetto fondamentale per la determinazione delle strategie di conservazione in situ ed ex situ (Frankel et al., 1995). Le specie relitte vere e proprie sono specie estinte nelle altre regioni della penisola e del continente in epoche antecedenti la fine dell'ultimo evento glaciale e sopravvissute in numero estremamente limitato di popolazioni; le specie rare, invece, sono spesso divenute tali per cause antropiche (scomparsa degli habitat) in epoche successive alla fine dell'ultima glaciazione. Un simile isolamento favorisce fenomeni di speciazione che

rendono tali organismi progressivamente differenti da quelli a loro più vicini ma che si evolvono in ambienti diversi (Cox e Moore, 1985). Il mantenimento della diversità genetica rappresenta un aspetto fondamentale per la sopravvivenza a lungo termine delle specie relitte poiché l'assenza di variazione può ridurre moltissimo la capacità delle popolazioni di adattarsi ai nuovi cambiamenti ambientali. In particolare ci si aspetta che quelle specie distribuite in popolazioni piccole ed isolate mostrino livelli di diversità genetica molto bassi per effetto della deriva genetica e del ridotto flusso genico tra le popolazioni.

La caratterizzazione genetica degli individui, se integrata con le informazioni sulla loro struttura spaziale, sull'età e il grado di parentela con gli altri individui, permettono la ricostruzione di un'accurata struttura genetica spaziale delle popolazioni (Williams et al., 2007). Questo aspetto è molto importante poiché l'organizzazione spaziale degli individui tra loro correlati nella popolazione, fornisce uno strumento per capire la modalità di dispersione del polline e dei semi (Gerber S. et al., 2003 e Garcia C. et al., 2007). Inoltre, poiché spesso l'impollinazione avviene tra individui vicini, una precisa comprensione della struttura genica della popolazione può permettere anche di predire la frequenza di incroci autogami ed allogami (Gerber S. et al., 2003).

L'uso di marcatori molecolari consente di tracciare e quantificare il flusso genico all'interno e tra le differenti popolazioni al fine di valutare il suo contributo alla diversità genetica delle popolazioni di un habitat frammentato. Questo dà la possibilità di stimare l'ammontare della riproduzione sessuale ed asessuale all'interno delle popolazioni e le relazioni di parentela tra piante adulte e prole al fine di comprendere se l'habitat frammentato può rappresentare una limitazione all'esoincrocio e quindi una costrizione al mantenimento della diversità genetica tra individui all'interno della popolazione. A tale scopo l'utilizzo di marcatori neutrali per la genotipizzazione delle piante adulte, giovani e dei semi, può essere particolarmente utile

per ricostruire la distribuzione spaziale e la struttura genetica accurata delle popolazioni e per descrivere le curve di dispersione del polline e dei semi all'interno e tra le popolazioni. I dati molecolari in questi casi possono anche essere integrati con altre informazioni biometriche ed ecologiche nonché con la georeferenziazione delle piante adulte. I principali processi evolutivi che modificano il pool genetico delle popolazioni naturali, ossia gli alleli e le loro frequenze, sono la selezione naturale, le mutazioni, la ricombinazione, il flusso genico e la deriva genetica. Tali componenti non hanno però un significato adattativo (hanno semmai un significato preadattativo). Infatti, l'adattamento è quel processo mediante il quale caratteri che migliorano le probabilità di sopravvivenza e riproduzione di un individuo, si affermano (vengono selezionati), dando luogo ad organismi più adattati all'ambiente. Esso è il risultato della "selezione naturale", la quale è la forza dominante dell'evoluzione dei caratteri e rappresenta l'insieme dei fattori che tendono a favorire o sfavorire la tendenza a riprodursi di un dato genotipo. Le mutazioni, cambiamenti ereditabili del DNA all'interno di un dato locus sono forze che possiedono la capacità di alterare le frequenze alleliche in una popolazione, di solito convertendo una forma allelica di un gene in un'altra. Certi geni influenzano il tasso generale di una mutazione e molti fattori ambientali (come agenti fisici, chimici e infettivi) possono aumentare il numero di mutazioni. La ricombinazione si ha nei fenomeni di sessualità come nella riproduzione sessuata presente sia in organismi unicellulari che pluricellulari grazie alla quale si ottengono gameti con nuove combinazioni geniche (meiosi, crossing-over, assortimento casuale di cromosomi paterni e materni). Ma i processi che sotto certi aspetti ci interessano di più perchè riguardano le dinamiche migratorie, sono il flusso genico e la deriva genetica. Il flusso genico (gene flow) è l'apporto di nuovi geni ad opera di individui che entrano a far parte di una popolazione. Gli effetti del flusso genico dipenderanno dalle diverse modalità riproduttive della specie (outcrossing e self crossing) (Slatkin, 1987). I processi dispersivi sono i

meccanismi chiave che variano la struttura genetica e la diversità nelle specie forestali. In effetti le relazioni tra struttura genetica e flusso genico sono notevolmente complicate nelle piante a seme per l'esistenza di almeno due componenti del movimento genico: quello del polline e quello del seme, seppure in alcune specie la moltiplicazione vegetativa può però giocare un ruolo importante (Oddou-Muratorio et al., 2001). Quindi per ottenere informazioni sul flusso genico da patterns genetici, è necessario utilizzare marcatori molecolari che seguano tali movimenti migratori, grazie all'utilizzo, accanto ai marcatori nucleari di marcatori citoplasmatici (Soltis et al., 1992, Mc Cauley, 1994), generalmente ereditati da uno dei due genitori (eredità uniparentale). Nelle angiosperme nella maggior parte dei casi il DNA plastidiale e quello mitocondriale sono ereditati dalla madre. Naturalmente paragonandoli ai marcatori nucleari che sono ad eredità biparentale otteniamo informazioni sulla dispersione del polline (aploidia) e del seme (diploidia) (Petit, 1992; Ennos, 1994; Hu e Ennos, 1999)

Per distinguere gli effetti storici della frammentazione da quelli antropici, il DNA plastidiale è il marcatore più utilizzato in indagini filogeografiche, dove l'analisi filogenetica è messa in relazione alle informazioni geografiche ed ecologiche. Attraverso l'analisi filogeografica è possibile individuare caratteri specifici propri di una determinata popolazione e mettere in relazione popolazioni provenienti da diverse aree geografiche.

Inoltre nei vegetali, l'utilizzo di differenti marcatori molecolari permette anche di evidenziare l'occorrenza dei fenomeni di ibridazione. L'introduzione di specie aliene o di varietà coltivate, a seguito del flusso genico e dell'ibridazione con le popolazioni autoctone, può provocare dei cambiamenti nella diversità genetica di queste ultime. L'introggressione genica tra le specie relitte ed il materiale vegetale introdotto dall'uomo può anche rivelarsi deleteria introducendo geni indesiderati e poco adatti nel patrimonio genetico delle popolazioni autoctone. A tal fine l'analisi genetica consente di comprendere l'eventuale presenza di introggressione con le specie

coltivate introdotte dall'uomo in prossimità delle popolazioni relitte residenti. Tali analisi permettono di individuare tracce di mescolanza genetica con le popolazioni relitte autoctone e di determinare il loro effetto sul mantenimento e la protezione delle risorse genetiche locali. L'ibridazione può avvenire sporadicamente tra specie simpatriche o essere confinata ad aree geografiche di contatto in cui l'isolamento sessuale è imperfetto o assente. Tali aree, definite zone ibride, sono regioni limitate in cui popolazioni geneticamente distinte entrano in contatto dando vita a progenie di discendenza mista (Barton e Hewitt, 1989). In virtù dei differenti livelli di isolamento riproduttivo e di differenziamento ecologico tra due taxa, un processo di ibridazione può dare esiti diversi: il rafforzamento delle barriere riproduttive, la produzione di una popolazione effimera che è mantenuta in un habitat disturbato, il trasferimento di materiale genetico tra taxa in esame come conseguenza del reincontro degli ibridi con uno delle specie parentali (introgressione). L'introgressione e l'ibridazione sono due processi frequenti nelle piante spesso difficili da valutare, che possono anche variare l'estensione di una specie. Riesberg e Soltis (1991) hanno ipotizzato che l'introgressione (interspecific gene exchange) è significativa per il trasferimento interspecifico di geni. Essa potrebbe aumentare o diminuire la fitness relativa ad un taxa, permettendo la colonizzazione di nuovi taxa e/o la creazione di nuove specie. L'introgressione può rompere eventuali barriere tra due taxa parzialmente isolati con la conseguenza di una loro eventuale fusione (Grant, 1963). Dal punto di vista molecolare viene identificata dalla "cattura citoplasmatica", ossia il ritrovamento di tratti del genoma citoplasmatico di una specie nel genoma nucleare di un'altra specie. Infine un'altra causa di variazione delle frequenze genetiche è la "deriva genetica". Sewal Wright, un brillante genetista di popolazioni che formulò molti principi teorici su questa disciplina, propugnò negli anni trenta l'importanza della deriva genetica. Un tipico esempio si ha quando la dimensione della popolazione rimane costantemente piccola per un periodo di tempo

prolungato. Questa situazione è senza dubbio frequente in special modo dove le popolazioni occupano habitat marginali o quando la competizione limita la crescita delle popolazioni. In tali circostanze la deriva genetica può giocare un ruolo importante nell'evoluzione delle frequenze geniche. Le frequenze geniche possono aumentare o diminuire in ciascuna generazione e con l'andar del tempo variano casualmente o vanno alla deriva, da qui il termine, deriva genetica. In alcuni casi, molti alleli possono essere persi dalla popolazione e in alcuni casi la popolazione resta "fissata" per l'allele rimasto. Una volta che l'allele sia stato fissato nelle popolazioni, non potrà avvenire alcuna variazione nelle frequenze a meno che altri alleli non vengano reintrodotti per mutazione o migrazione. Durante la deriva anche il numero di eterozigoti nella popolazione diminuisce e l'eterozigosità tende a zero, pertanto il secondo effetto della deriva è condurre alla perdita di variabilità genetica all'interno della popolazione. In tale ambito, particolarmente interessanti appaiono le indagini che hanno preso in considerazione la storia evolutiva e la distribuzione attuale delle specie forestali. Gli studi sviluppati in questo settore negli ultimi anni hanno permesso di fornire interessanti risultati sulla distribuzione e caratterizzazione delle risorse genetiche delle più importanti specie forestali in Europa.

Non si può affermare che i platani siano minacciati a livello di specie, ma i numerosi ostacoli posti alla propagazione naturale, come la frammentazione e la riduzione rispetto all'areale potenziale del territorio, dovute all'intensa antropizzazione subita dal paesaggio vegetale meridionale, creano difficoltà per il mantenimento della variabilità genetica (Pasta et al., 2000).

L'insieme di tutti questi processi ha un forte impatto sulla struttura genetica dei popolamenti forestali relitti ed influenza la loro capacità di adattarsi ai futuri cambiamenti ambientali. La disponibilità di informazioni su questi processi assume quindi una grande importanza ed è un prerequisito fondamentale per stilare efficienti programmi di gestione e conservazione delle risorse genetiche delle specie arboree relitte.

Il progetto, quindi si prefigge i seguenti compiti:

1. Determinazione della struttura genetica delle popolazioni, flusso genico intra ed inter popolazionale:

Particolare attenzione viene data al potenziale aumento dei livelli di inincrocio a causa del flusso genico ridotto nelle popolazioni relitte in condizioni naturali di rigenerazione. Innanzitutto si individuano le relazioni tra piante adulte nella popolazione utilizzando i dati genetici. Successivamente, la struttura spaziale della diversità genetica è comparata tra due generazioni (piante adulte e semi) al fine di monitorare il flusso pollinico, mediante un'analisi di paternità dei semi (comparando, cioè, il profilo genetico dei semi con quello dei possibili donatori di polline, essendo nota la pianta madre). Queste curve di dispersione del polline consentono di valutare l'importanza del trasporto del polline a lunga distanza rispetto alla diffusione a breve distanza. Inoltre questo tipo di analisi consente anche, di stimare il tasso di esoincrocio di ogni popolazione.

2. Identificazione e quantificazione del flusso genico con genotipi introdotti:

A tale scopo sono stati utilizzati marcatori microsatellitari altamente specifici del genoma nucleare (Lang K. R., 2010). La quantità e la direzione di un'eventuale ibridazione con materiale introdotto è stimata mediante comparazione genetica con popolazioni geograficamente correlate di materiale introdotto, nel presente caso *Platanus x acerifolia*. Si verifica inoltre, la presenza di eventuali alleli non specifici delle popolazioni oggetto di studio ed essi sono eventualmente correlati allo scambio genico con popolazioni introdotte dall'uomo. Quindi per evidenziare l'eventuale presenza di ibridazione ed introgressione (presumibilmente nella direzione dalle popolazioni introdotte a quelle residenti), sono prelevate campioni di foglie dalle popolazioni introdotte artificialmente e che circondano ciascuna popolazione relitta

selezionata. A causa dell'alta affinità genetica tra individui autoctoni ed introdotti, ci si aspetta che i marcatori diagnostici (specifici della popolazione) siano molto rari.

3. Diversità genetica attuale e storica:

A tale scopo sono stati analizzati campioni storici di *Platanus orientalis* provenienti dalle collezioni botaniche e campagne di raccolta effettuate nell' 800. Il fine è di valutare se nelle popolazioni attuali si osserva una riduzione della diversità genetica recente rispetto alle popolazioni storiche. Ai risultati saranno applicati Metodi di Rarefaction, per rendere comparabili le stime della diversità genetica. I campioni d'erbario sono stati prelevati dall'Herbarium Neapolitanum (NAP) del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Napoli Federico II. Esso nasce all'inizio dell'800 con l'istituzione del Real Orto Botanico (1807). La prima collezione che ne fece parte fu quella di Michele Tenore (1780-1861), in cui sono conservati gli exsiccata che l'Autore raccolse sin dal 1796 (Santangelo A., 1995). Tra le varie collezioni conservate nell' Erbario dell'Orto Botanico, tre sono quelle che ci hanno interessato, nella ricerca sulla diversità genetica su *Platanus orientalis*, precisamente:

- Collezione Tenore: Nell'erbario tenoreano, ordinato secondo la classificazione linneana, sono conservati i campioni raccolti da Michele Tenore a partire dal 1796, come indica l' Index Herbarii Tenoreani ab anno 1796 ad an. 1859. Essa è costituita da 127 fascicoli di piante vascolari, un fascicolo di muschi, un fascicolo di epatiche, un fascicolo di licheni (Santangelo A., 1995) ;
- Collezione Gussone generale: Questa raccolta di Giovanni Gussone costituisce la più imponente delle collezioni dell'Herbarium Neapolitanum. Nata come "Erbario generale", raccoglieva i campioni inviati dai più famosi botanici italiani e stranieri al Real Orto Botanico di Napoli, ma soprattutto, le numerose raccolte che il discepolo di Tenore effettuò a partire dal 1806 nelle regioni del Regno di Napoli; Oggi risulta costituita da due sezioni: la prima

(Sez. I), che conserva la struttura originale, è composta da 136 fascicoli; la seconda (Sez.II), profondamente modificata nella struttura e nell'ordinamento sistematico, è composta da 81 fascicoli (Santangelo A., 1995) (Fig.13);

- Collezione Gussone Sicilia: Questa collezione rappresenta il frutto del lavoro che Gussone svolse in Sicilia a partire dal 1817, anno in cui venne chiamato a dirigere, per volere dell'allora Principe ereditario Francesco I, il nuovo Orto Botanico di Boccadifalco presso Palermo. Tra il 1817 e il 1827 senza interruzione e poi saltuariamente fino al 1857; La collezione, in cui sono conservati circa 12.000 exsiccata, è costituita da 103 fascicoli di piante vascolari e da un fascicolo di crittogame (Santangelo A., 1995).

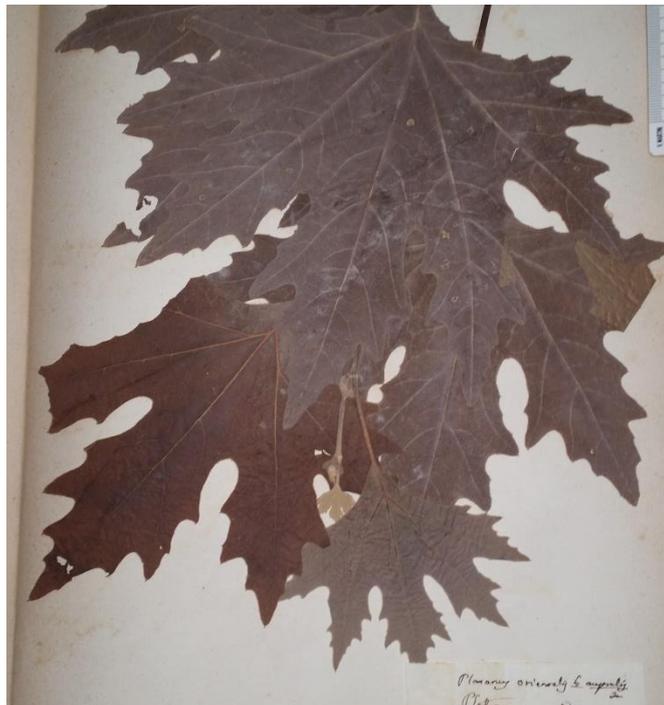


Figura 13 *Platanus orientalis* Collezione Gussone Generale.

4. Pattern di relazioni filogeografiche:

Il marcatore d'elezione per tale tipo di analisi è il DNA plastidiale che ha eredità uniparentale, (deriva unicamente dalla madre ed è trasmesso alla progenie attraverso i semi). Gli aplotipi che si otterranno da questo tipo di analisi aiuteranno a capire le relazioni tra le popolazioni relitte

italiane e quelle del resto dell'areale e a verificare se la dispersione genica, mediante il trasferimento artificiale mediato dall'uomo, può alterare la composizione genetica dei popolamenti naturali.

MATERIALI E METODI

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DA MATERIALE FRESCO E CAMPIONI D'ERBARIO

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata da foglie o gemme di *P. orientalis* secondo il protocollo proposto da Doyle & Doyle (1987, modificato) (Porebski et al., 1997). I vantaggi di questo metodo sono che è economico e semplice da eseguire, ottimo per specie con elevata quantità di metaboliti secondari soprattutto di natura polisaccaridica ed infine permette di estrarre grandi quantità di DNA genomico.

Il protocollo si basa su tre fasi fondamentali:

1. LISI: per lisare la parete cellulare, il materiale fogliare viene triturato meccanicamente e poi trattato con un buffer d'estrazione costituito da CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), EDTA (acido etilendiamminotetracetico) e sali (TrisHCl, NaCl). Questo buffer d'estrazione ha anche la funzione di catturare i lipidi e le proteine che costituiscono la membrana cellulare e nucleare. Con NaCl, contenuto sempre nel buffer, si forma un complesso insolubile con il DNA. L'EDTA chela i metalli come gli ioni Mg_{2+} , importante perché sono cofattori della DNasi: quindi, legandosi Mg_{2+} ed EDTA, l'attività della DNasi viene a diminuire. Il Tris-HCl serve a mantenere un corretto valore di pH, infatti un pH basso o alto danneggiano il DNA. La preparazione del buffer di lisi prevede l'aggiunta di β -mercaptoetanolo, un antiossidante capace di inibire la perossidasi, la polifenolo ossidasi e più in generale di mantenere un ambiente riducente.
2. ESTRAZIONE: in questa fase sono eliminati i polisaccaridi, le proteine ed altri lisati cellulari disciolti in soluzione. Ulteriori residui vengono lavati con cloroformio: tale composto è in grado di denaturare le proteine e facilitare la separazione tra fase acquosa e fase organica.
3. PRECIPITAZIONE: in questa fase il DNA viene lavato con alcol.

Quindi ogni campione è stato frantumato meccanicamente e risospeso in 600µL di tampone di lisi CTAB 2X. La lisi è stata effettuata a 65°C per 40 minuti, agitando spesso il campione, ed è stata seguita da 5 minuti di incubazione su ghiaccio. Per rimuovere i restanti contaminanti proteici dalla soluzione sono state effettuate varie estrazioni con solventi organici (cloroformio : alcol isoamilico, 24 : 1). Il DNA è stato successivamente precipitato tramite l'aggiunta, alla sola fase acquosa, di 0.7 volumi di alcol isopropilico ed incubato a -80°C per circa un'ora o a -20°C per tutta la notte. Segue una centrifugazione per 30 minuti a 4°C a 12000 x g. Il pellet è stato lavato in EtOH 70% freddo, asciugato e risospeso in 50µl di acqua bidistillata sterile.

I DNA genomici estratti sono stati conservati poi a -20 °C in appositi contenitori per eseguire le successive analisi.

Per quanto riguarda i campioni d'erbario essi sono stati prelevati dall'erbario storico dell'Orto Botanico di Napoli e provengono sia dalla collezione "Tenore" che da quella "Gussone". La caratteristica dei campioni d'erbario è che sono difficilmente amplificabili, poiché quando vengono conservati negli erbari, per evitare infestazioni da parassiti essi vengono periodicamente trattati con pesticidi di varia natura, che però si depositano anche sui campioni ed essi spesso risultano essere degli inibitori nella successiva reazione di amplificazione. Per ovviare a questo problema i campioni dopo essere stati estratti con la tecnica del CTAB, appena descritta, che ci permette di recuperare un buona quantità di DNA anche da campioni secchi e quantitativamente molto ridotti, vengono fatti passare su una colonnina del kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) a scambio ionico. Al campione già estratto sono stati aggiunti 350µl di soluzione di lisi A e 50µl di soluzione di lisi B, seguito da vortex. La soluzione è stata successivamente incubata a 65°C per 10 minuti. Sono stati aggiunti 130µl di soluzione precipitante per far precipitare i residui cellulari, lasciando il materiale per 5 minuti in ghiaccio. Segue una centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti per far pellettare i residui

cellulari, le proteine e i polisaccaridi. Il surnatante ottenuto è stato inserito su una colonnina di filtrazione GenElute™ e successivamente centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto, questo passaggio è servito per eliminare i residui cellulari non rimossi dal precedente step. Sono stati aggiunti 700µl di Binding Solution al precedente surnatante con successivo mescolamento per inversione. Sono stati aggiunti 500µl di column preparation solution alla colonnina GenElute™ Miniprep Binding Column e centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto, al fine di massimizzare il legame del DNA alla membrana della colonnina, il liquido ottenuto è stato scartato. Successivamente sono stati caricati 700µl della miscela Binding Solution e DNA nella colonnina GenElute™ Miniprep Binding Column, e il tutto è stato centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto. Il liquido ottenuto è stato scartato, e si ripetuto il passaggio precedente con il materiale rimasto. Il liquido è stato scartato con la provetta, lasciando la colonnina, che è stata inserita in una nuova provetta. Si è quindi passati alla fase di lavaggio della colonnina con l'utilizzo di 500µl di Wash Solution, seguito da una centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto. Il liquido è stato scartato e si è ripetuto il passo precedente con una centrifugazione di 13000 rpm per 3 minuti per eliminare tutto l'etanolo residuo presente nella Wash solution. Sono aggiunti, infine, 50µl di Elution Solution, preriscaldata a 65°C, direttamente sul filtro della colonnina per eluire il DNA. Il materiale è stato successivamente centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto, al fine di ottenere il DNA eluito.

ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

La concentrazione del DNA estratto è stata stimata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. L'elettroforesi su gel permette di separare, identificare ed eventualmente purificare frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. Poiché la capacità di migrazione è funzione della concentrazione di agarosio presente nel gel, si utilizzano, in base alla lunghezza dei frammenti di DNA da separare, gel a diverse concentrazioni di agarosio. In questo caso è stato utilizzato un

gel d'agarosio costituito dallo 0.8% di agarosio in TEB 1X con aggiunta di bromuro di etidio. Il bromuro di etidio si intercala tra le basi di DNA producendo una fluorescenza rosso-arancio quando viene esposto a radiazioni ultraviolette (260-360 nm). La corrente applicata al gel determina la formazione di un campo elettrico che fa migrare il DNA dal polo negativo al polo positivo, in virtù delle cariche elettriche negative conferitegli dai gruppi fosfato. Molecole di DNA lineari a doppio filamento migrano con una velocità che è inversamente proporzionale al \log_{10} del loro peso molecolare. Un'aliquota del campione di DNA estratto viene caricata sul gel e fatta migrare contemporaneamente ad un marcatore di peso molecolare noto detto ladder. Il DNA presente nel ladder è il risultato della digestione enzimatica del genoma del Fago Λ ad opera dell'enzima di restrizione Hind III. I frammenti di DNA del ladder sono di peso noto ed alla fine dell'elettroforesi formano un'utile scala di riferimento dei pesi molecolari. Terminata la corsa il gel può essere osservato e fotografato con l'ausilio di un transilluminatore UV. La presenza del bromuro di etidio rivela immediatamente la posizione che il DNA ha assunto nel gel e l'intensità della banda è proporzionale alla sua concentrazione.

AMPLIFICAZIONE DELLE REGIONI MICROSATELLITARI

Le sequenze ribosomali e plastidiali sono state amplificate mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR). La PCR è un metodo di amplificazione in vitro di sequenze specifiche di acidi nucleici, a partire anche da una singola molecola di DNA stampo (template). Gli stampi di DNA sono filamenti singoli che possono essere prodotti semplicemente riscaldando il DNA a temperature prossime ai 90°C.

Il risultato di questo processo è la formazione di due molecole figlie di DNA a doppia elica, identiche tra loro e composte da un filamento parentale e da un filamento di DNA di nuova sintesi complementare. L'enzima che catalizza la polimerizzazione delle catene

polinucleotidiche a partire da singoli monomeri nucleotidici è noto come DNA polimerasi. Quest'enzima mantiene la sua funzionalità anche in vitro, quindi può essere utilizzato in laboratorio per sintetizzare nuove molecole di DNA tramite la reazione della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). I passaggi di base della PCR sono: denaturazione al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato, appaiamento (annealing) di coppie di oligonucleotidi di sequenza specifica (primer) scelti in modo da essere omologhi a sequenze che si trovano all'interno dello stampo di DNA e allungamento (extension) da parte della DNA polimerasi a partire dai primer per copiare lo stampo di DNA. Questi tre passaggi sono ripetuti molte volte (per molti cicli, in genere tra i trenta e i quaranta) per amplificare lo stampo di DNA. Se in ciascun ciclo viene prodotta una copia di ciascuno dei filamenti dello stampo, il numero di molecole di DNA raddoppia in maniera esponenziale a ogni ciclo. A causa di quest'andamento esponenziale, alla fine di 20 cicli sono stati prodotti più di un milione di copie del tratto di DNA d'interesse. Usando la Taq DNA polimerasi, l'amplificazione per PCR funziona, in genere, nel modo migliore se i primer si legano a regioni dello stampo che non distano più di 1-3 kb (può anche copiare frammenti lunghi fino a 10 kb).

I campioni di DNA di *P. orientalis* testati in questo studio sono stati amplificati tramite l'uso di primers specifici identificati da un lavoro della Dott.ssa K. R. Lang (2010) scelti tra i 12 a nostra disposizione. All'estremità 5' dei primers forward, è stato aggiunto un fluorocromo: FAM (blu), ATTO550 (nero), ATTO565(rosso), HEX(verde); i primers reverse, invece, ne erano privi.

Nel dettaglio:

Locus	Primer sequence 5'-3'	Repeat motif	Size range (bp)
plms17	F:GGAGAAAGAGAAGAAGGAGAAAA R:AGGGTCTTGGTCGTGATTTG	(CA)8	219 - 239
plms29	F:GCCATTAGATGGGTTGAAA R:AGCGAATCCATGTGCCTAAT	(TC)9	198 – 233
plms53	F:GCAACTTGTTCTTGGTTGGT R:CAGCCGATTGGGTATATGGT	(CTT)4	324 – 329

plms68	F:TGAATCCCAAAAGGCAAAA R:AAACACCCAATCCGGTCTAC	(GT)8(AT)2(GT)5	176 – 206
plms71	F:ACGGGTGAGCTCCCTACTTT R:GACATCCTCCACCAAACACC	(TG)10	126 -137
plms92	F:TCCTTACATCTTTGCCCCACA R:CCCATGAACCTCTCTGATCC	(GA)4(GT)5	315 – 317
plms109	F:TGATGACAAATACTCAGGGAAA R:CGATAGCCAAAAGCGAAAGA	(CA)18	121 – 153
plms113	F:GGCAAGCCAGGATTTAGTTG R:CGGGATAAGAGTTTGTGAGTTG	(CT)11(CA)16	189 – 231
plms122	F:CTTCTGTGCTTGTGCCTCAC R:CTTTGCACCAATGTGCCTTCC	(AC)6	223 – 225
plms130	F:TACCACACCAACGTCCTTCC R:ACCCTCTCAAATATGCCAATTA	(CA)7	201 – 218
plms147	F:AAAGCTAACATCCCCTCATTG R:GCGGTCCTGTCTTAGTATGT	(GT)8	266 -315
plms176	F:AACAGCAAACAGCCCCTC R:AAACCAGCCAATCCAATTCC	(CA)9	256 – 279

Una serie di prove effettuate nelle popolazioni in esame sono servite a definire la reazione specifica di PCR ottimizzate, così allestite, con volume finale di 10 µl.

Miscela di reazione

- DNA	20 ng
- Buffer	1X
- MgCl	2,5 mM
- dNTP	25 mM
- Taq DNA polimerasi (home made)	0,8 unità
- primer forward	10µM
- primer reverse	
- Volume totale di reazione	10 µl

Per lo screening dei loci, le reazioni di amplificazione sono state svolte in un termociclatore PCR system 2720 Applied Biosystem. I loci scelti sono stati sottoposti ad una serie di reazioni di PCR

per ottimizzare le condizioni di amplificazione, in termini di temperatura di annealing e di concentrazione del prodotto amplificato.

Il programma impostato è stato ottimizzato per ogni locus microsatellitare:

1. Inizializzazione: 94°C per 3 min.
2. Denaturazione: 94°C per 30sec.
3. Annealing : da 50°C a 62°C (a seconda del locus da amplificare) per 1min.
4. Estensione: 72°C per 1min.
5. Estensione finale: 72°C per 7min.

Le fasi 2, 3 e 4 sono ripetute per 30 o 35 cicli.

Una volta scelti i loci microsatellitari è stato effettuato il sizing degli alleli che consiste nel rilevare le dimensioni alleliche relative ai vari loci, questo è possibile poiché il primers forward è stato legato covalentemente ad un fluorocromo all'estremità 5'. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con uno standard interno GS500(-250)LIZ. Purtroppo dei 12 loci amplificati è stato possibile procedere all'analisi soltanto di 7 di essi poiché pur avendo effettuato numerose prove con diversi protocolli di amplificazione ancora non è stato possibile stabilire con precisione lo scoring degli alleli poiché dall'elettroferogramma del sequenziatore sono visibili numerosi picchi dovuti probabilmente alla formazione di concatameri durante la reazione di amplificazione.

ELETTROFORESI CAPILLARE SU MICROSATELLITI

La tecnica dell'elettroforesi capillare (CE) fu introdotta nei primi anni '80 e si tratta di una strumentazione completamente automatizzata. Nell'elettroforesi capillare la separazione dei campioni avviene all'interno di un capillare in silice fusa, riempito di un polimero viscoso che funge da setaccio molecolare: il diametro ridotto del capillare (compreso tra i 50 ed i 100µm)

permette di poter impiegare ΔV 10-100 volte superiori a quelle impiegate per elettroforesi su gel, diminuendo notevolmente i tempi di corsa. Le estremità del capillare sono immerse in due serbatoi contenenti un tampone di corsa e in cui si trovano due elettrodi, responsabili della generazione del campo elettrico. I campioni vengono iniettati nel capillare elettrocineticamente, attraverso l'esposizione ad alto voltaggio per pochi secondi, o aspirati mediante l'applicazione di un'elevata pressione. Per la separazione, alle estremità del capillare viene applicata una differenza di potenziale che fa migrare le molecole del campione verso l'elettrodo di carica opposta in funzione della loro carica e massa. Il segnale emesso dai fluorocromi, eccitati da un laser posto in prossimità dell'estremità anodica, viene registrato da un rivelatore attraverso una finestrella in corrispondenza del punto in cui manca il rivestimento sul capillare. Il rivelatore è costituito da una fotocamera CCD, ovvero un sensore in silicio in grado di rilevare la lunghezza d'onda della luce emessa dal fluorocromo eccitato. Attraverso dei filtri virtuali i vari colori vengono separati e, grazie a una matrice matematica, nello spettro di emissione di ogni singolo dye viene sottratto il contributo degli altri, in modo da normalizzare l'intensità della fluorescenza. I vari picchi dell'elettroferogramma corrispondenti ai prodotti di PCR vengono così identificati e associati con il colore appropriato. I dati vengono infine inviati a un computer che, mettendo in relazione il picco di fluorescenza con il tempo di migrazione, trasforma il segnale fluorescente in dato di lunghezza d'onda espresso in bp. I moderni strumenti per l'elettroforesi capillare, come l'ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), in uso anche presso il nostro laboratorio, sono in grado di analizzare contemporaneamente frammenti che si sovrappongono in dimensioni, marcati con differenti fluorocromi che emettono fluorescenza a diverse lunghezze d'onda (Butler J.M. et al., 2004). Per ciascun individuo da tipizzare 1 μ l del campione di PCR viene aggiunto a una miscela di reazione costituita da 10 μ l di formamide deionizzata che ha la proprietà di ridurre la forza

ionica del campione e 0.07µl di standard interno Genescan™ 500 LIZ®. La formamide è anche un potente denaturante e questa proprietà risulta molto utile perché l'elettroforesi capillare per SSR deve essere condotta su DNA a singolo filamento. Lo standard interno LIZ è una miscela di 16 frammenti di DNA di lunghezza nota compresa tra 35 e 500 coppie di basi marcati con un fluorocromo diverso (LIZ®) da quelli utilizzati per i primers di amplificazione. Lo standard interno viene utilizzato per costruire una curva di calibrazione che mette in relazione la taglia dei frammenti con il tempo necessario per migrare all'interno del capillare fino al detector. Grazie ad esso è possibile determinare la lunghezza dei filamenti di DNA di interesse.

ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI: ASSEGNAZIONE ALLELICA E DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO

Il processo di acquisizione dei dati dell'elettroforesi permette solamente di visualizzare gli alleli sotto forma di picchi in un elettroferogramma o di bande su un gel. L'informazione contenuta nei vari picchi (taglia e quantità dei frammenti di DNA) deve essere convertita in un linguaggio comune per permettere il confronto dei dati tra i diversi laboratori. Questo linguaggio comune è il genotipo, o profilo genetico, cioè l'allele, in caso di omozigosi, o gli alleli, in caso di eterozigosi, presenti in un campione ad ogni locus. Il genotipo viene espresso con una serie di numeri che indicano il numero di ripetizioni in tandem presenti in ogni allele. La conversione dell'elettroferogramma in profilo genetico viene effettuata tramite una serie di software. Per analizzare i microsatelliti dopo la corsa ci si avvale di sistemi informatici. L'elettroferogramma prodotto dal sequenziatore automatico che opera l'elettroforesi viene processato da un apposito software, come ad esempio GeneMapper®, commercializzato dall'Applied Biosystems, utilizza un algoritmo di calibrazione basato sullo standard interno LIZ (Fig. 14) per analizzare

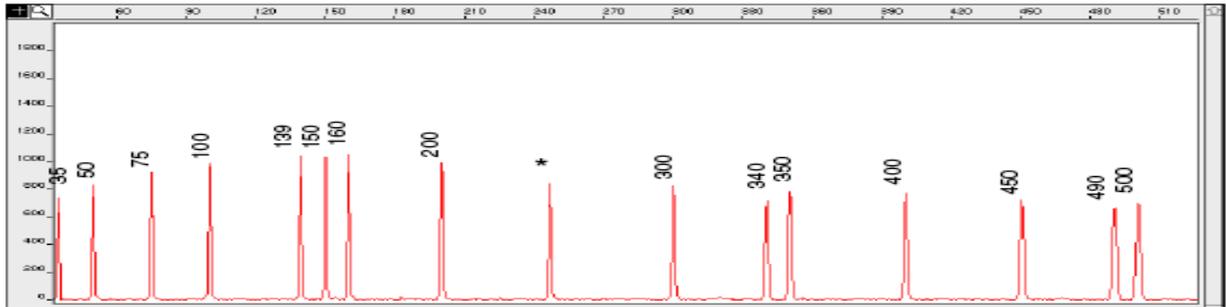


Figura 14 Un * per il picco di 250 bp sta ad indicare la migrazione anomala di doppi filamenti che non si sono completamente separati dopo la denaturazione; quindi non viene considerato nell'assegnazione delle dimensioni dei frammenti di DNA dei campioni.

l'elettroferogramma e restituire all'operatore un grafico come quelli mostrati in Figura 15;

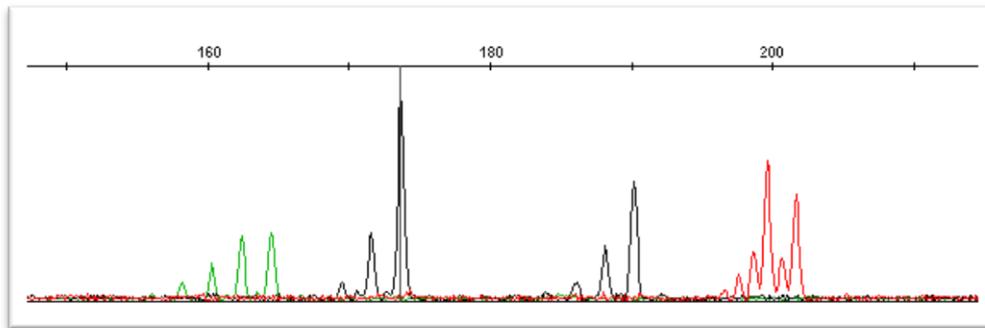


Figura 15 Elettroferogramma dopo l'analisi col software GeneMapper®.

sulle ordinate è riportata l'intensità della lettura mentre sulle ascisse la lunghezza del frammento espressa come numero di basi.

Ciascuno dei 16 frammenti risulta in un singolo picco in seguito a denaturazione.

Per poter analizzare statisticamente i dati ottenuti dalle indagini molecolari è stata costruita una matrice che consentisse l'utilizzo dei dati nei vari software di analisi. La matrice compilata in foglio di testo è stata di volta in volta adattata al programma d'analisi attraverso l'utilizzo del software convertitore, Converter (Glaubitz J. C. 2004), capace di riarrangiare i dati forniti in un foglio di testo creando un output corrispondente ad una matrice input per i programmi di analisi. Per l'elaborazione dei dati sono stati usati differenti programmi poiché non sempre un

unico software è adatto a calcolare tutte le analisi statistiche per la genetica di popolazione. Inoltre questo approccio consente la verifica incrociata dei dati analizzati e la scelta, da parte dell'operatore, dell'input che meglio chiarisca i risultati.

ANALISI STATISTICHE SU DATI MICROSATELLITARI

Stima della variabilità genetica

Per la stima della variabilità genetica sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- L'eterozigosità attesa (H_e) in una popolazione dove avvengono accoppiamenti casuali;
- L'eterozigosità osservata (H_o) che è la proporzione di individui eterozigoti osservati per ciascun locus;
- Le frequenze alleliche, il numero di alleli e il numero medio di alleli per locus (N_A). Il numero medio di alleli per locus è un parametro che dipende molto più degli altri dalle dimensioni del campione, poiché generalmente nelle popolazioni naturali vi sono molti alleli a bassa frequenza (tra 0.1 e 0.5), che possono non essere osservati in campioni piccoli;
- L'allelic richness, AR, (El Mousadik & Petit, 1996; Comps et al., 2001), o numero medio degli alleli per locus; questa misura della diversità genetica è legata al numero di alleli diversi standardizzato rispetto alla dimensione della popolazione minima (Leberg, 2002);
- Gli alleli privati per locus per ogni popolazione;
- La percentuale di polimorfismo nelle popolazioni, valutando la percentuale di loci polimorfici in ogni popolazione.
- Per il calcolo degli indici citati sono stati utilizzati i software di analisi FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al., 2001) e GENALEX ver. 6.5b3 (Peakall & Smouse, 2006) e Arlequin 3.5 (Excoffier L., 2005)

- Differenziamento tra le popolazioni
- Statistiche F di Wright e G_{st}

La divergenza genetica tra le varie popolazioni è stata stimata tramite gli indici delle statistiche F (Wright, 1951; Weir & Cockerham, 1984) e G_{st}.

Gli F-statistici rappresentano un set di strumenti individuati da Wright (1951) per ripartire il deficit di eterozigosi all'interno degli individui appartenenti alla stessa popolazione e tra individui appartenenti a diverse popolazioni. Sono largamente usati per assegnare i livelli strutturali in campioni di popolazioni naturali.

L'indice F_{is}, o coefficiente di inbreeding, misura il deficit di eterozigoti all'interno di ogni popolazione. Esso viene stimato per tutte le popolazioni e per tutti i loci attraverso il software FSTAT ver 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

L' F_{st} misura il deficit di eterozigosi tra le popolazioni, ed è stata anche calcolata la matrice di F_{st} tra coppie di popolazioni. Per il calcolo del parametro F_{st} è stato utilizzato il metodo descritto da Weir & Cockerham (1984).

La differenziazione delle popolazioni è stata calcolata utilizzando anche un altro coefficiente che è l'indice G_{st} unbiased Nei (1987). Nei propose un approccio alternativo all'F_{st} di Wright per determinare la differenziazione delle popolazioni, che si basa sulle frequenze alleliche da cui deriva l'eterozigosità attesa, inter ed intra popolazionale. Questi calcoli sono stati effettuati con il programma GENETIX (Belkhir K., et al 1999).

- Amova

L' Analisi della Varianza Molecolare, 'AMOVA', è stata effettuata col software Arlequin 3.5 (Excoffier L., 2005). L' AMOVA verifica quanta della varianza totale delle frequenze alleliche calcolate è spiegata o dalle differenze tra gruppi di popolazioni o dalle differenze tra individui entro i gruppi.

- Analisi delle componenti principali (PCA)

L'analisi della struttura delle popolazioni è basata sulle frequenze alleliche per ogni popolazione. La PCA è una tecnica della statistica multivariata utilizzata per la semplificazione dei dati. Con questa tecnica si possono ridurre il numero delle variabili mantenendo la massima quantità di informazione possibile. Con il software adegenet package (Jombart T., 2008) for R 2.15.1 (Development Core Team R., 2012) vengono costruite combinazioni lineari delle distanze genetiche. I dati trasformati vengono proiettati in un sistema cartesiano nel quale le variabili con la maggiore varianza vengono mostrate sul primo e secondo asse rispettivamente. Sono ipotizzabili riarrangiamenti del grafico ottenuto, considerando anche il terzo asse, che di fatto è quello con il minor valore di varianza.

- Analisi Bayesiana (Structure)

L'identificazione della struttura delle popolazioni che meglio si adatta ai nostri dati è stata effettuata mediante l'algoritmo di raggruppamento bayesiano implementato nel software Structure versione 2.3.3 (Pritchard et al., 2000), che permette di classificare gli individui in cluster a partire dai loro genotipi multilocus, assumendo la presenza di equilibrio di Hardy Weinberg (HWE) e di linkage disequilibrium (LE) all'interno dei gruppi. Il numero di questi ultimi (K) e l'assegnazione degli individui a ciascuno di essi sono definite sulla base della probabilità a posteriori. E' stata condotta un'indagine costituita da 10 corse indipendenti di 1.000.000 di iterazioni Markov chain Monte Carlo- MCMC (con burnin di 50.000), per un intervallo di K (numero di cluster) compreso tra 1 e 10. Il modello utilizzato è stato quello di discendenza per mescolamento (admixture model), che prevede che gli individui possano avere antenati recenti in più di un gruppo e il modello delle frequenze alleliche correlate, che assume che le frequenze alleliche nei vari gruppi inferiti possano essere simili, a causa di migrazione o discendenza

comune. La scelta finale del valore più probabile di K è stata effettuata con il software Structure Harvester che utilizza il metodo di Evanno (Evanno et al., 2005; Earl, Dent A., 2012).

- Mantel Test

In una situazione in cui la distribuzione di una specie sia continua (senza cioè la presenza di barriere fisiche al flusso genico), ma l'accoppiamento sia ristretto solo a distanze limitate (ad esempio a causa di scarse capacità di dispersione), le popolazioni più lontane possono risultare differenziate per un fenomeno detto "isolation by distance" (Wright, 1943) che consiste per l'appunto in un graduale aumento della differenziazione genetica con l'aumentare della distanza geografica tra le popolazioni. Per verificare l'esistenza o meno di correlazione tra le popolazioni a seconda della loro localizzazione geografica è stato usato il software R 2.15.1 (Development Core Team R., 2012) che computa una regressione tra le distanze genetiche tra le varie popolazioni e le corrispondenti distanze geografiche, o il loro logaritmo. Per le distanze genetiche sono stati utilizzati i valori di $F_{st}/(1-F_{st})$, mentre come variabile indipendente si è scelto di usare il logaritmo naturale delle distanze geografiche (Rousset, 1997).

LIBRARY MICROSATELLITARE

Per poter ampliare il numero di loci microsatellitari da amplificare ed ottenere una significatività dei dati ancora maggiore è stata creata una library microsatellitare con l'utilizzo di un protocollo ritrovato in letteratura basato sulla tecnica FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats) (Zane et al., 2002) a cui sono state apportate delle modifiche. Il protocollo si basa sulla reazione estremamente efficiente di digestione-ligazione della procedura AFLP (AFLP, Vos et al., 1995). Il DNA è prima digerito con l'enzima MseI e poi ligato all'adattatore AFLP MseI (5'-TACTCAGGACTCAT-3' / 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3') con le seguenti condizioni: 25-250ng di DNA genomico, tampone 1X, Enzima MseI 1µl, in un volume totale di

50µl; incubazione over night a 37°C. Metà della digestione cioè 25µl li utilizzo per la reazione di ligasi: adattatori MseI (A+B) 50µM, buffer ligasi 1X, 1U T4 ligasi, in un volume finale di 30µl; incubazione per 1ora a 22°C. Gli adattatori AFLP hanno due importanti caratteristiche che assicurano un'elevata efficienza: (i) gli adattatori non sono fosforilati dopo essere stati sintetizzati, e questo impedisce una ligazione tra loro; e (ii) le loro sequenze sono progettate in modo che la ligazione del DNA digerito con l'adattatore non ripristina un sito MseI, consentendo così che la digestione e la ligazione possano essere eseguite simultaneamente. La miscela di digestione-ligazione viene direttamente amplificata in un volume totale di 25µl con uno specifico AFLP adaptor-primer (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-A/C-3': in seguito denominati MseI-A e MseI-C). Le condizioni di PCR sono (Vos et al., 1995): 2 e 4 µl di ligasi (per verificare quale viene meglio) Buffer 1X, MgCl₂ 1.5mM, Primer (MseI-A+MseI-C 262ng/µl) 120ng-0.4 µl, dNTP 200 µM, 0,4 unità di Taq DNA polimerasi. La reazione viene incubata in una macchina GeneAmp PCR 9700 (Perkin Elmer) impostata a denaturazione iniziale a 94°C 3min; 30 cicli di 94°C-30sec, 53°C-1min, 72°C-1min, ed estensione finale per 7min a 72°C. I prodotti di PCR sono visibili su gel di agarosio sotto forma di uno smear e sono selezionati per essere utilizzati successivamente. Il DNA viene quindi ibridato secondo il Travis Glenn protocol (<http://129.252.89.20/Msats/Microsatellites.html>), con 4 sonde biotilate: (AC)₁₅; (GA)₁₅; (AT)₁₅ e (GC)₁₅. In dettaglio, 250-500 ng di DNA amplificato vengono miscelati con 50-80pmol di oligonucleotide biotilato (4 in totale) e 50µl di Hybridization solution in un volume totale di 100µl. Il DNA viene denaturato a 95°C per 5min e poi seguono 99 cicli a 70°C per 5sec con un decremento di 0.2°C per ogni ciclo (si parte da 70°C e si arriva a 50.2°C nell'ultimo ciclo), poi seguono altri 20 cicli a 50°C per 5sec con un decremento di 0.5°C per ogni ciclo (si parte da 50°C e si arriva a 40°C nell'ultimo ciclo) ed infine 15°C per 10min. Le molecole di DNA ibridate a sonde biotilate sono selettivamente catturate da beads rivestite di streptavidina (streptavidin

magnetic particles, Boehringer Mannheim), che vengono preparate, come segue, prima del loro utilizzo nel protocollo: 100µl (10mg/ml) di beads viene abbondantemente lavato in 200µl di TEN100 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl a pH 7.5) e successivamente vengono effettuati altri due lavaggi con 300µl di TEN100 ed infine risospese in 40µl dello stesso tampone. Per ridurre al minimo i legami aspecifici di DNA genomico, ai 40µl di beads, appena ottenute, si miscela anche 1µg di un prodotto di PCR estraneo. Le beads preparate vengono miscelate alle molecole di DNA ibridizzato con gli oligo (100µl), diluito con 300µl di TEN100, e incubate per 60 minuti a temperatura ambiente con costante delicata agitazione. Il complesso beads-probe-DNA è separato con un magnete dal buffer di ibridazione, che viene poi scartato. Il DNA non specifico è rimosso da tre lavaggi non stringenti e tre lavaggi stringenti. Ogni lavaggio avviene per 5 minuti a temperatura ambiente con miscelazione delicata. Il DNA viene recuperato per separazione con un magnete ogni volta. I lavaggi non stringenti sono eseguiti aggiungendo 400µl di TEN1000 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M di NaCl, pH 7.5), mentre i lavaggi stringenti sono eseguiti aggiungendo 400µl di SSC 0.2X- SDS 0.1% al DNA. Si conserva il surnatante, sia dell'ultimo lavaggio non stringente che l'ultimo lavaggio stringente, per un uso successivo. Aggiungo alle beads 200µl di TE1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) e denaturo in PCR a 95°C per 5min. Sequestro poi le beads con un magnete e conservo il surnatante che ora contiene il nostro DNA arricchito. Precipito poi, il DNA recuperato con 2 volumi di etanolo assoluto ed 1/10 di Sodio acetato 3M. Il tutto viene incubato a -20°C per 1h e poi si centrifuga alla massima velocità. Lavo il pellet con etanolo 70% ed asciugo a temperatura ambiente. Infine risospendo il pellet in 25µl di acqua. Al fine di verificare l'avvenuto arricchimento microsatellitare allestisco una PCR utilizzando 2.5µl del DNA arricchito e per verificare di non aver perso materiale amplifico 2.5µl anche dell'ultimo lavaggio stringente e non stringente che idealmente non dovrebbero produrre nessun prodotto di amplificazione, il che indica la

rimozione completa di DNA non specificamente legato, mentre la quota di DNA arricchito dovrebbe produrre uno smear intorno ai 200bp. I primers usati in quest'ultima amplificazione (nelle condizioni già descritte sopra) sono i primers MseI-A ed MseI-C con le overhangs per il successivo sequenziamento alla Next Generation Sequencing (NGS) presso la company privata, BIOFAB Research.

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

Il campione di DNA Siciliano ottenuto dal protocollo per arricchimento microsatelitare (FIASCO) è stato sequenziato con un sequenziatore di seconda generazione illumina MiSeq in paired-end sequencing 2x300. Il sequenziamento con Illumina MiSeq consiste in tre fasi principali: la costruzione della libreria rappresentativa, l'amplificazione e il sequenziamento. Nella prima fase viene costruita una libreria rappresentativa ridotta (RRL) in cui il DNA viene prima frammentato e poi a ciascuno dei frammenti di DNA ottenuti viene legato un adattatore alle estremità 5' e 3'.

Nella seconda fase i campioni di DNA vengono aggiunti alla flow-cell che presenta dei primers che per complementarità si legano agli adattatori. Diverse fasi di PCR consentono l'amplificazione della libreria di DNA usando la "bridge amplification" (Fig. 16). Ad ogni ciclo di amplificazione le reads formeranno la cosiddetta struttura a ponte e consentiranno la sintesi di un nuovo filamento di DNA. Successivamente il nuovo doppio filamento di DNA viene denaturato e i 2 filamenti separati fungeranno da stampo per un altro ciclo. Dopo molti cicli si formeranno tanti cluster degli stessi frammenti di reads.

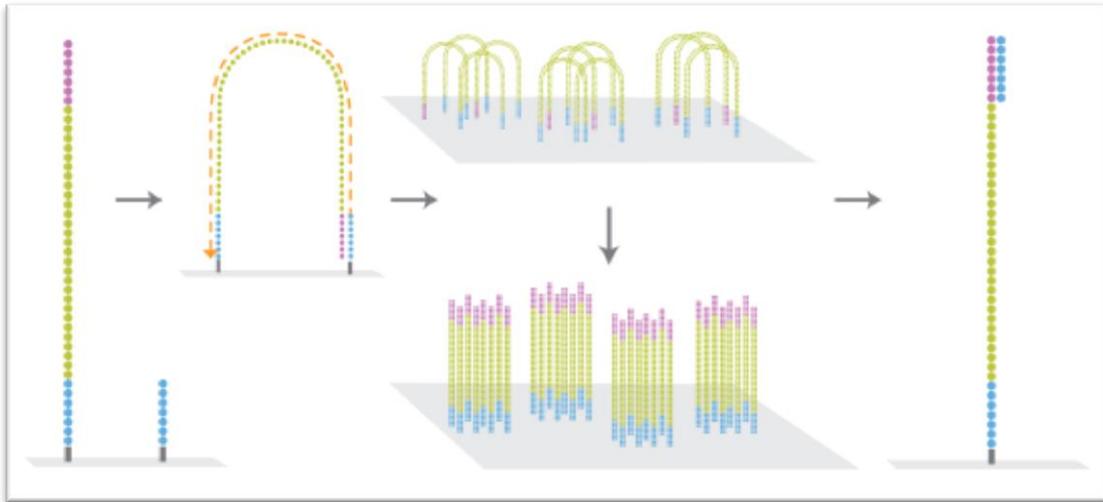


Figura 16 L'immagine mostra come avviene la "bridge amplification" durante la fase dell'amplificazione.

La terza fase è il sequencing by synthesis grazie alla quale è possibile determinare la sequenza nucleotidica man mano che vengono aggiunti nuovi desossiribonucleotidi. Questi ultimi sono nucleotidi modificati che presentano dei terminatori di catena reversibili legati all'estremità 3' OH. I terminatori di catena presentano dei gruppi fluorescenti in grado di emettere un fascio di luce diverso a seconda del tipo di nucleotide che viene rilevato. Questi terminatori di catena sono reversibili perché si staccano in seguito alla scansione con il laser che rileva la frequenza emessa e allo stesso tempo libera l'estremità 3' OH rendendola libera per l'aggiunta di un altro nucleotide. Il file di output del sequenziatore è in formato FASTQ. Un file FASTQ riporta informazioni sulla specie analizzata, la sequenza nucleotidica e dei simboli che riportano per ogni nucleotide la qualità del sequenziamento.

ESPERIMENTI DI GERMINAZIONE

L'estrazione di DNA per le analisi di paternità è difficile da eseguire sui semi di *Platanus orientalis* poiché in essi coesistono tessuti di tre differenti origini: il tegumento, formato da tessuto materno; l'endosperma o tessuto nutritivo, risultato di un differente evento di

fecondazione, ed infine l'embrione vero e proprio. La separazione di questi tessuti è difficoltosa e può causare contaminazioni, per questo è preferibile eseguire l'estrazione sulle plantule. E' consigliabile, inoltre, escludere dall'uso i cotiledoni perché potenzialmente capaci di inficiare la tipizzazione del DNA in quanto a volte risultano poliploidi. Da tutto questo nasce l'esigenza di allestire una coltivazione di *P. orientalis* a partire dai semi raccolti dalle capsule consentendo alle piante di sviluppare almeno la prima e la seconda foglia per le analisi.

Numerosi sono stati gli esperimenti di germinazione messi in atto sui semi di *Platanus orientalis*.

Per determinare le migliori condizioni di luce e temperatura in cui ottenere la germinazione dei semi in analisi, superando al contempo il problema della dormienza, è stata allestita una prima serie di prove di germinazione. Circa 300 semi da 3 individui diversi di *Platanus orientalis* sono stati conservati a 4°C al buio ed all'asciutto per molti giorni. Per la germinazione sono stati preparati contenitori di polistirolo con suolo su cui sono stati seminati i semi e poi ricoperti con un altro sottile strato di suolo e posizionati nei locali adibiti a serra del nostro dipartimento: ma c'è stata la germinazione solo di pochissimi semi, le plantule sono morte dopo poche settimane; successivamente lo stesso tipo di contenitore con le medesime condizioni è stato messo a germinare in camera climatica le cui condizioni di luce e temperatura sono di 24°C per 14h di ore di illuminazione al giorno ma ugualmente non si è ottenuto alcun risultato positivo. Abbiamo quindi provato a posizionare i semi su capsula petri ricoperta di fogli assorbenti intrisi d'acqua e collocati in camera climatica: dopo già alcuni giorni i semi cominciavano a germinare ma si sono ricoperti in pochissimo tempo di muffe che hanno portato alla morte delle giovani plantule; abbiamo quindi pensato ad un trattamento preventivo dei semi detto "scarificazione" che consiste nel lavaggio con una soluzione commerciale di ipoclorito di sodio diluita 1:5 (ottenendo una soluzione all'1% circa) e poi risciacquati accuratamente con acqua distillata.

Dopo il lavaggio i semi sono stati disseminati su carta da filtro sterile inumidita e riposizionati in camera climatica. Dopo qualche giorno si è osservata la germinazione dei semi con la nascita dei cotiledoni ed anche con il passare dei giorni non è stata osservata alcuna traccia di muffa; le plantule nate su carta da filtro sono state progressivamente trasferite su suolo a grana media per consentire l'approfondimento della radichetta ed innaffiate regolarmente, ma dopo circa una settimana si è di nuovo osservata la morte di tutte le giovani piante. A questo punto abbiamo di nuovo sottoposto 100 semi al processo di scarificazione e li abbiamo seminati in vaschette di plastica contenenti sabbia sterile a grana fine e richiuso la vaschetta con pellicola trasparente per mantenere il giusto grado di umidità ma permettere al contempo alla luce di passare (Fig. 17). Dopo circa 4gg. abbiamo osservato la nascita delle prime radichette e dopo altre due giorni sono cominciate a spuntare anche le prime foglioline. Un picco di germinazione, del 30%, è stato raggiunto durante il quinto giorno. Le plantule così trattate hanno sviluppato la prima e la seconda foglia divenendo così idonee alle prove per i test di paternità. Dalle plantule mature sono stati rimossi i cotiledoni e raccolte soltanto la prima e la seconda foglia ed opportunamente sottoposte ad estrazione del DNA.



Figura 17 Germinazione semi di *Platanus orientalis*.

ANALISI DI PATERNITA'

Col termine “analisi di paternità” si intende una serie di metodiche di indagine volte a determinare l'identità di uno o di entrambi i genitori di un individuo. Esistono vari approcci al problema, ma l'utilizzo di tecniche molecolari per l'attribuzione di paternità è andato crescendo negli ultimi anni. La maggior parte delle analisi di paternità viene eseguita avendo a disposizione dei marcatori del DNA che abbiano un'elevata variabilità o un numero di marcatori meno polimorfici, ma che possano essere combinati in modo da permettere la discriminazione di individui diversi. I marcatori genetici maggiormente studiati e conosciuti in questo ambito sono rappresentati dai microsatelliti. Il presupposto fondamentale affinché i microsatelliti possano essere utilizzati per l'analisi di paternità è l'assenza di mutazioni tra genitori e figli e che gli adulti e la prole che presentano gli stessi genotipi siano tra di loro correlati. Il tasso di mutazione per singolo locus per generazione è stato stimato intorno a 10^{-4} - 10^{-5} , che è sufficientemente basso tale da poter considerare irrilevante la probabilità di una mutazione tra genitori e figli (Dow et Asheley, 1998). In linea di principio qualunque marcatore genetico, capace di trasmettersi stabilmente da genitore a figlio, è utilizzabile per l'analisi di paternità, ma i microsatelliti si sono dimostrati particolarmente adatti allo scopo per via di alcune loro caratteristiche principali:

- Polimorfismo: individuazione di variazioni tra individui in regioni specifiche del genoma;
- Trasmissione mendeliana semplice;
- Codominanza: possibilità di riconoscere gli eterozigoti dagli omozigoti;
- Assenza di effetti epistatici: assenza di interazioni interlocus;
- Neutralità: il marcatore molecolare non deve avere effetto a livello fenotipico;
- Indipendenza dall'ambiente esterno: l'identificazione del marcatore molecolare non deve essere influenzata dalle variazioni delle condizioni ambientali;

- Semplicità: velocità e basso costo della metodologia;
- Riproducibilità in laboratori diversi;
- Contenuto informativo: riguarda l'informatività dei marcatori molecolari e cioè la loro capacità di distinguere e comparare il più alto numero di alleli;
- Multiplex Ratio: è il numero di loci differenti che può essere simultaneamente analizzato in un esperimento.

L'elevato polimorfismo e valore informativo, insieme alla codominanza, fanno degli SSR i marcatori genetici ideali, rendendoli un ottimo strumento per la caratterizzazione genetica di specie di interesse, per le analisi forensi e di parentela, nonché per il miglioramento genetico. Tipizzando il DNA di molti semi prodotti da una stessa pianta e confrontandone il patrimonio genetico con un campione di DNA prelevato dalla pianta-madre è possibile stimare il numero di piante maschili che hanno fecondato con successo un certo fiore.

AMPLIFICAZIONE DEI MARCATORI PLASTIDIALI VIA PCR

Per distinguere gli effetti storici della frammentazione da quelli antropici, il DNA plastidiale è il marcatore più utilizzato in indagini filogeografiche, dove l'analisi filogenetica è messa in relazione alle informazioni geografiche ed ecologiche. Attraverso l'analisi filogeografica è possibile individuare caratteri specifici propri di una determinata popolazione e mettere in relazione popolazioni provenienti da diverse aree geografiche.

A tale scopo sono stati utilizzati 15 marcatori plastidiali universali; nello specifico 8 primers individuati dagli autori Daniel Ebert e Rod Peakall (2009) e 7 primers individuati dagli autori facenti parte del CBOL (Consortium for the Barcode Of Life) plant working group (2009).

In dettaglio:

Elenco primers Ebert & Peakall

Primer Name and orientation	Gene	Primer Sequences 5'-3'
ANU_cp013-L	<i>psbK</i>	Tgtttggcaagctgctgtaa
ANU_cp014-R	<i>Trns(GCU)</i>	Gggttcgaatccctctcttt
ANU_cp018-L	<i>trnG(UCC)ex1</i>	Agcctccaagctaacgatg
ANU_cp020-R	<i>atpA</i>	Ccttttgaaggaagctattcagg
ANU_cp021-L	<i>atpA</i>	Ccttctgcaaattcgactaa
ANU_cp022-R	<i>atpFex2</i>	Caaggagctctaggaactctga
ANU_cp029-L	<i>atpI</i>	Ttggaacctctatttgc
ANU_cp030-R	<i>rps2</i>	Atttgtgagggccgttct
ANU_cp064-L	<i>trnV(UAC)ex2</i>	Agggctatacggactcgaac
ANU_cp066-R	<i>trnV(UAC)ex1</i>	Tcagttaggtagagcacctcgt
ANU_cp073-L	<i>psaI</i>	Tgcaatggcttctttatttct
ANU_cp074-R	<i>Ycf4</i>	Tctatccatagtgttctgatcg
ANU_cp081-L	<i>petE/G</i>	Ggggatcagttggatctttg
ANU_cp082-R	<i>trnP(UGG)</i>	Caggttcaaactctgtcatcc
ANU_cp093-L	<i>clpPex1</i>	Aggtacttttggaaacaccaat
ANU_cp094-R	<i>psbB</i>	Cgacagtatgaacacgatacc

Elenco primers CBOL

Primer Name and orientation	Gene	Primer Sequences 5'-3'
accD_1F	<i>accD</i>	Agtatgggatccgtagtagg
accD_2F	<i>accD</i>	Ggrgcacgtatgcaagaagg
accD_4R	<i>accD</i>	Tcttttaccgcaaatgcaat

ndhj_1F	<i>ndhj</i>	Catagatctttgggcttyga
ndhj_4R	<i>ndhj</i>	Tcaatgagcatcttgatttc
rpoB_1F	<i>rpoB</i>	Aagtcattgttgaactgg
rpoB_2F	<i>rpoB</i>	Atgcaacgtaagcagttcc
rpoB_3R	<i>rpoB</i>	Ccgtatgtggaaaagaagtata
rpoC 1_1F	<i>rpoC 1</i>	Gtggatacacttcttgataatgg
rpoC 1_2F	<i>rpoC 1</i>	Ggcaaagaggggaagatttcg
rpoC 1_4R	<i>rpoC 1</i>	Ccataagcatatcttgagttgg

Al fine di ottenere l'amplificazione dei marcatori scelti è stata utilizzata la tecnica denominata PCR.

Il protocollo per l'amplificazione dei loci scelti è stato adattato alle singole esigenze di ciascun marcatore, ma basandosi sul protocollo di base opportunamente modificato a seconda del caso.

Il programma impostato è stato ottimizzato per ogni locus plastidiale:

1. Inizializzazione: 94°C per 3min.
2. Denaturazione: 94°C per 30sec.
3. Annealing : 53°C per 1min.
4. Estensione: 72°C per 45sec.
5. Estensione finale: 72°C per 7min.

Le fasi 2, 3 e 4 sono ripetute per 35 cicli.

REAZIONI ED ANALISI DI SEQUENZA

Dopo l'amplificazione i campioni vengono purificati con un passaggio su colonnine. Tutti gli amplificati ottenuti dai taxa analizzati, dopo la purificazione vengono direttamente sequenziati. Le sequenze così ottenute sono state poi controllate, editate ed allineate, facendo riferimento ai corrispettivi elettroferogrammi, con l'uso di BIOEDIT 7.1. La costruzione degli alberi relativa ai marcatori plastidiali è stata effettuata utilizzando il software TCS1.21. Questo software implementa la stima della genealogia genica partendo da sequenze di DNA (Templeton et al., 2000). Il cladogramma risultante è analizzato col metodo della parsimonia.

ESTRAZIONE DEL DNA PLASTIDIALE

Notevoli sono stati gli sforzi per condurre un'estrazione efficiente di DNA plastidiale da foglie fresche di *P. orientalis*. Sono stati utilizzati molti protocolli ritrovati in letteratura (Sigma, chloroplast isolation kit; Michaud et al., 1995; Daza et al., 1982; Lang et al., 2011; Triboush et al., 1998; Shi et al., 2012), ma questi si sono rilevati fallimentari poiché erano protocolli messi a punto su specie erbacee e mai su foglie di specie arboree. L'analisi del DNA plastidiale totale richiede un isolamento dei cloroplasti dalle foglie, ma le foglie degli alberi contengono un'altissima percentuale di componenti fenolici e polisaccaridici (Do and Adams, 1991; Ziegenhagen et al., 1993), che rendono molto difficile questa estrazione. Per tale motivo è stata messa a punto una metodica nuova che ha previsto l'utilizzo combinato e variazioni di protocolli già presenti in letteratura (Chao Shi et al., 2012; Jansen et al., 2005; Moore et al., 2005; Doyle & Doyle, 1987). L'estrazione plastidiale consiste essenzialmente di tre fasi: Isolamento dei cloroplasti dalla foglia, lisi dei cloroplasti ed estrazione del DNA plastidiale dai cloroplasti.

Per poter procedere all'estrazione sono necessarie circa 15g di foglie giovani che bisogna tenere al buio per almeno sette giorni, in modo tale che l'amido presente in esse venga immobilizzato; infatti nelle foglie giovani sono presenti elevati quantitativi di amido e la sua presenza è l'ostacolo più grande per ottenere sufficienti quantitativi di DNA plastidiale puro. Inoltre è anche molto importante che tutti i passaggi avvengano su ghiaccio per evitare la degradazione dei cloroplasti. Prima di tutto le foglie vengono lavate, asciugate e tagliate poi vengono frullate con 5-10 colpi della durata di 5 secondi nel boccale del Waring blender (refrigerato a 4°C) con 400ml di Sandbrick Isolation Buffer (NaCl 1.25M; EDTA 5mM pH8; Tris-HCl 50mM pH8; 0.1% BSA; 5.0% w/v PVP K40 e β -mercaptoetanolo 10mM). Per eliminare pezzi di foglia non triturati bene, si filtra il tutto su 4 fogli di garza e un foglio di carta Miracloth. Si divide il filtrato in due bottiglie da 250ml e si centrifuga due volte a 4°C a 200g per 20 minuti. Questo passaggio serve ad eliminare i nuclei ed il debris cellulare che restano intrappolati nel pellet, mentre, il risospeso contiene i cloroplasti intatti. Per recuperare i cloroplasti centrifugo a 1000g per 20minuti ed elimino il surnatante. Risospendo, delicatamente con un pennellino, il pellet in 7ml di Sandbrick wash buffer (0.0001% w/v proteinasi K; EDTA 5mM pH8; Tris-HCl 10mM pH8, e β -mercaptoetanolo 10mM). Il campione risospeso viene delicatamente (per evitare la rottura del gradiente) caricato, con una pipetta pasteur di vetro, su un gradiente di saccarosio costituito da saccarosio 60% su saccarosio 90% (il buffer in cui viene disciolto il saccarosio è costituito da EDTA 25mM pH8 e Tris-HCl 50mM pH8) preparati in tubi per ultracentrifuga e centrifugato a 25000rpm per 45minuti. Appena terminata l'ultracentrifuga, con una pipetta pasteur di vetro si recupera l'interfaccia verde, che contiene solo i cloroplasti, tra il gradiente 90% e quello 60%. Tutto il campione recuperato viene lavato una volta con Sandbrick wash buffer e due volte con Standard wash buffer (sorbitolo 0.35M; EDTA 25mM pH8 e Tris-HCl 50mM pH8) e poi seccato. Il pellet viene infine risospeso in 2ml di acqua ed il DNA

plastidiale in esso contenuto viene estratto con il protocollo CTAB, Doyle & Doyle (1987, modificato), già precedentemente descritto. Il campione è stato poi inviato alla società Genomics 4life per sequenziamento NGS Illumina.

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

I campioni di DNA plastidiale ottenuti da Bulgaria, Cilento, Grecia e Sicilia sono stati sequenziati con un sequenziatore di seconda generazione illumina MiSeq in paired-end sequencing 2x300. Il sequenziamento con Illumina MiSeq consiste in tre fasi principali (come è già stato descritto precedentemente). Le librerie dei diversi campioni sono state preparate usando diversi tipi di protocolli. Il protocollo Illumina TruSeq è stato usato per i campioni di DNA estratti da Cilento, Grecia e Sicilia e Illumina Nextera per quello proveniente dalla Bulgaria.

RISULTATI E DISCUSSIONE

AREE DI CAMPIONAMENTO

Per lo scopo di questa tesi sono state condotte delle campagne di campionamento di *Platanus orientalis* durante gli anni 2011, 2013, 2014 e 2015 in Campania, Calabria e Sicilia, ed in Grecia, Turchia e Bulgaria per un totale di 429 individui, così distribuiti (Fig. 18):

NAZIONE	LOCALITA'	CORSO D'ACQUA	N° INDIVIDUI	TOTALE
ITALIA (Campania)	Cilento	Ramo Pagliarole	63	130
	Cilento	Badolato	6	
	Cilento	Palistro	30	
	Cilento	Fiumarella	11	
	Cilento	Alento Nord	15	
	Cilento	Alento Centro	2	
	Cilento	Alento Sud	3	
ITALIA (Calabria)	Catanzaro	Uria	25	25
ITALIA (Sicilia)	Messina	Alcantara	7	77
	Siracusa	Anapo	37	
	Messina	San Cataldo	20	
	Siracusa	Manghisi	13	
GRECIA	Epiro	Acheronte	41	101
	Epiro	Aòos	22	
	Creta (Augeniki)		15	
	Creta (Gortis)		13	
	Tracia	Nestos	10	
BULGARIA	Topolovo		10	31
	Kresna		10	
	Mikrevo		11	
TURCHIA	Dardanelles		11	19
	Beskonak		8	
ALBANIA	Tepelene	Drino	33	47
	Berat-Korce	Osum	14	

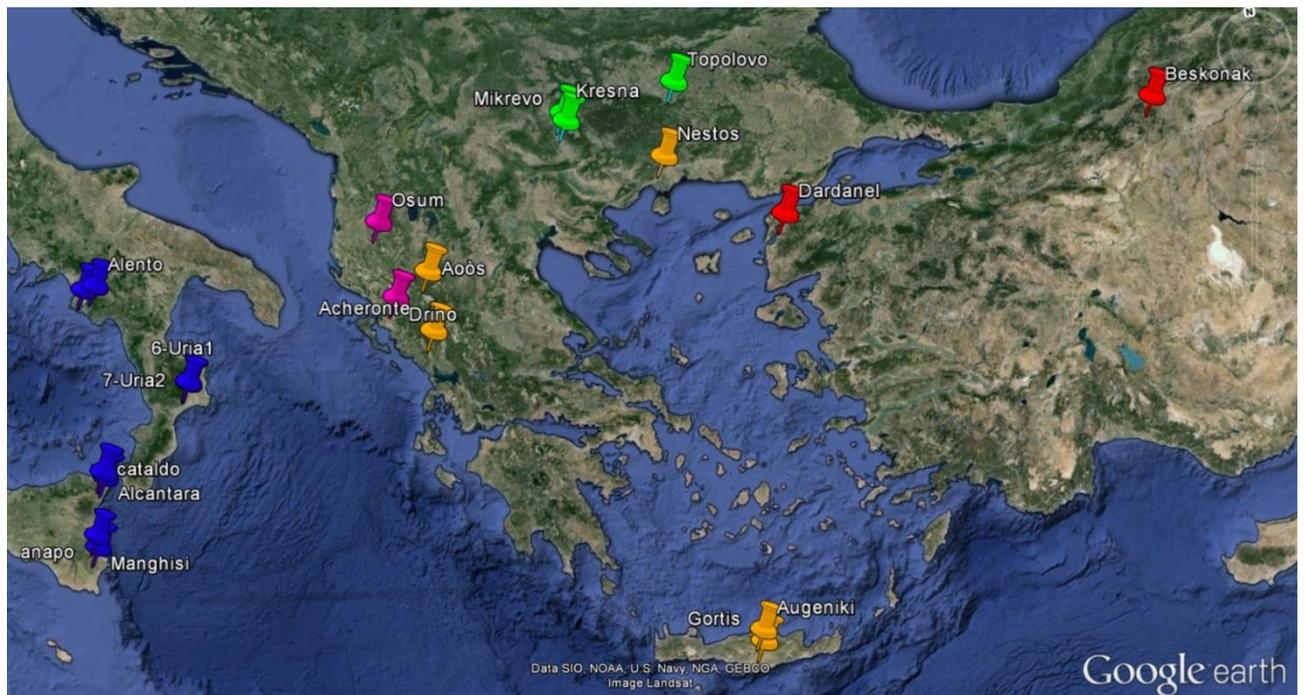


Figura 18 Distribuzione geografica del campionamento di *Platanus orientalis*

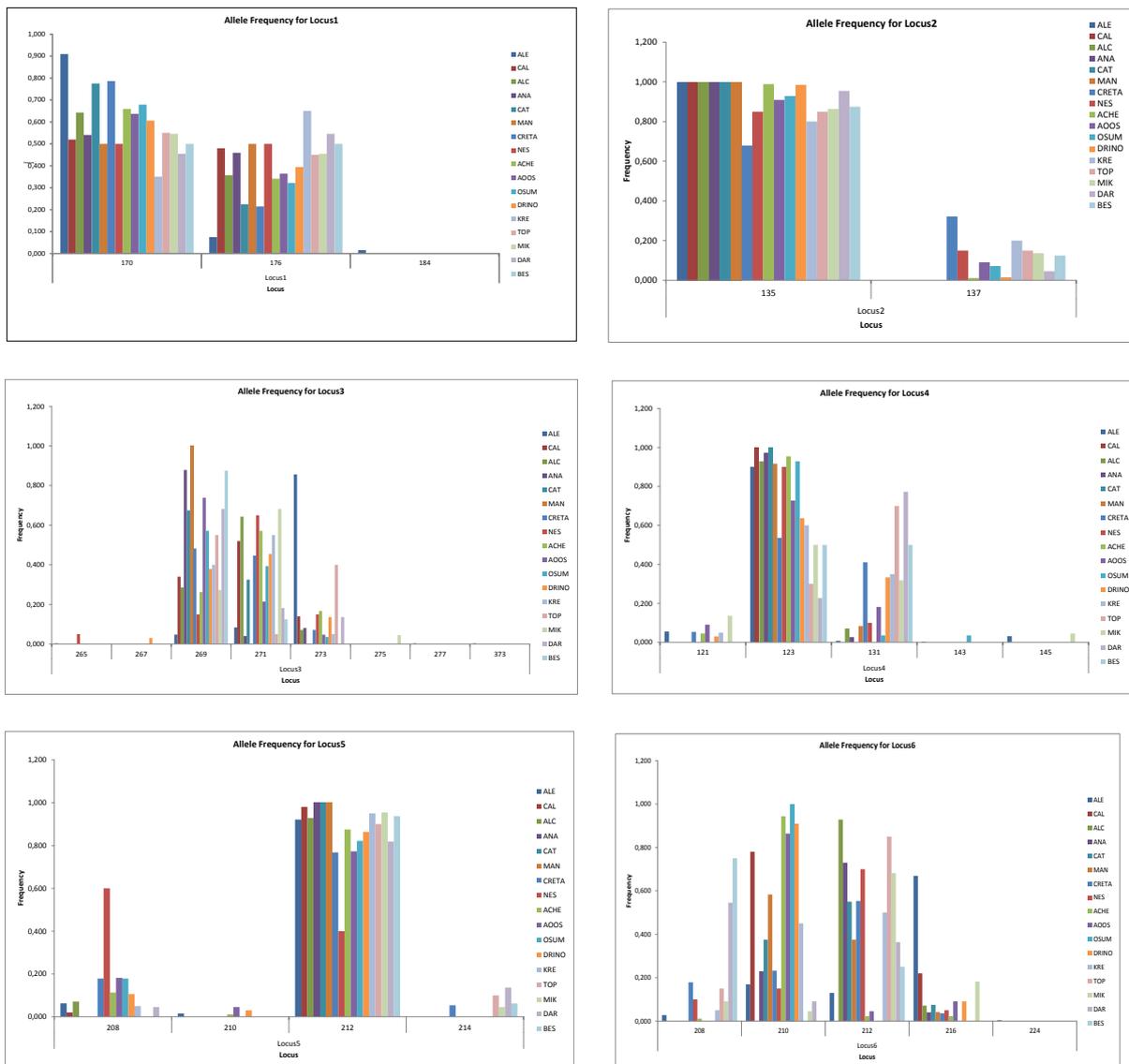
ANALISI DELLA VARIAZIONE ALLELICA MICROSATELLITARE

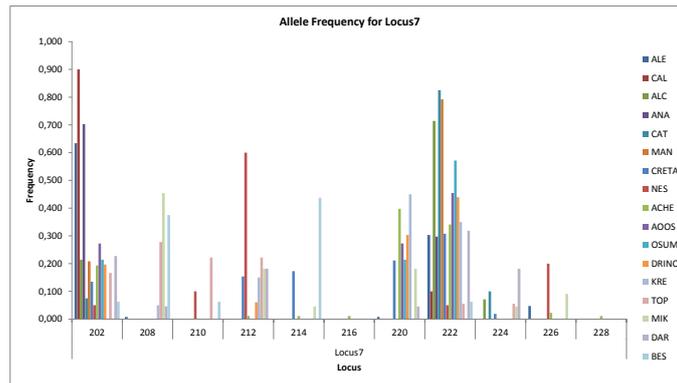
E' stata effettuata un' analisi della diversità genetica delle popolazioni di *Platanus orientalis* da differenti localizzazioni geografiche. Per la selezione dei loci microsatellitari utilizzati in questo studio si è proceduto ad un' analisi preliminare effettuando uno screening di 12 loci microsatellitari, già presenti in letteratura (K. R. Lang 2010).

Locus	Primer sequence 5'-3'	Repeat motif	Size range	Fluorocromo
plms29	F:GCCATTAGATGGGT	(TC)9	198 – 233	Hex
plms68	F:TGAATCCCAAAAGGC	(GT)8(AT)2(GT)	176 – 206	Fam
plms71	F:ACGGGTGAGCTCCCT	(TG)10	126 -137	Hex
plms109	F:TGATGACAAATACTCA	(CA)18	121 – 153	Atto 550
plms113	F:GGCAAGCCAGGATTT	(CT)11(CA)16	189 – 231	Atto 550
plms130	F:TACCACACCAACGTCC	(CA)7	201 – 218	Atto 565
plms176	F:AACAGCAAAACAGCC	(CA)9	256 – 279	Atto 565

Tale screening ha portato alla scelta di sette loci. Gli altri loci sono stati esclusi preliminarmente, in quanto pur avendo effettuate numerose prove con diverse condizioni di amplificazione, lo scoring allelico ha evidenziato fenomeni di allelia multipla e in alcuni casi la presenza di loci non polimorfici. Pertanto tutte le analisi sono state condotte considerando i suddetti sette loci per un totale di 429 individui.

Per i 7 loci analizzati il numero totale degli alleli è risultato essere di 38. Tutti i loci sono risultati polimorfici nelle varie popolazioni. Nei grafici sottostanti è organizzata la frequenza allelica per ogni locus e per ogni popolazione:

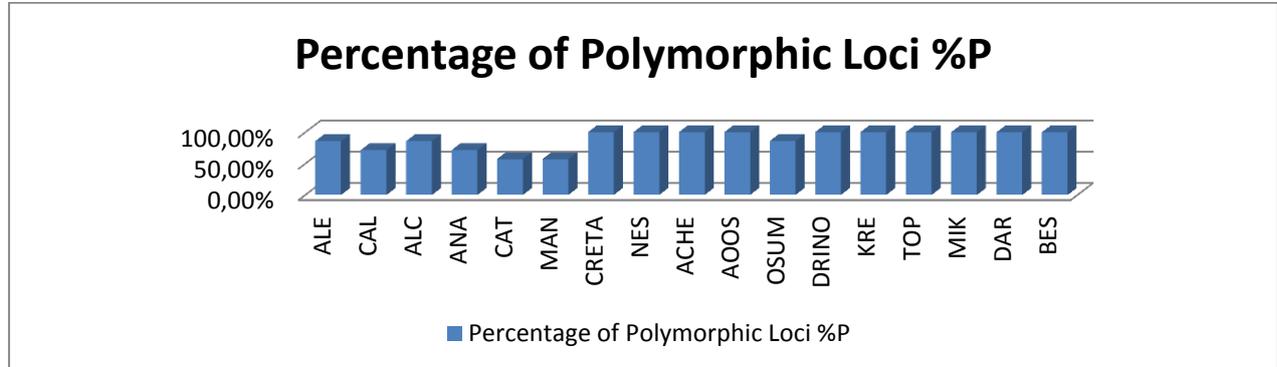




In tabella si possono visualizzare il numero di alleli per ogni locus in ogni popolazione:

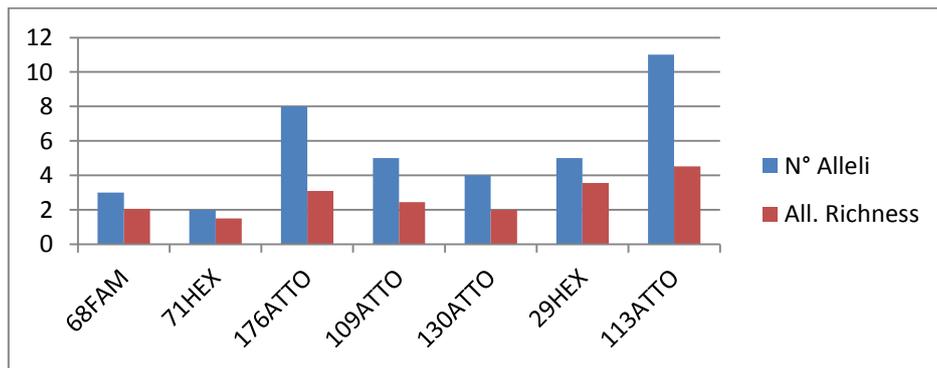
	Alento	Calabria	Alcantara	Anapo	Cataldo	Manghisi	Creta	Nestos	Acheronte	Aoos	Osum	Drino	Kresna	Topolovo	Mikrevo	Dardanelli	Beskonak
68Fam	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
71Hex	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
176Atto	5	3	3	3	2	1	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	2
109Atto	3	1	2	2	1	2	3	2	2	3	2	3	3	2	3	2	2
130Atto	3	2	2	1	1	1	3	2	3	3	2	3	2	2	2	3	2
29Hex	3	2	2	3	3	3	4	4	4	3	1	2	3	2	4	3	2
113Atto	4	2	3	2	3	2	6	5	8	3	3	4	4	6	6	6	5

A partire dalle frequenze alleliche è stata quindi stimata la percentuale di loci polimorfici nelle popolazioni:



Tale analisi comparativa ha evidenziato che le popolazioni italiane, periferiche nella distribuzione dell'areale, sono risultate, avere, una minore percentuale di polimorfismo allelico rispetto alle popolazioni greche e dell'est Europa dove invece tutti i loci sono caratterizzati da elevato polimorfismo. Le popolazioni italiane sono anche caratterizzate, in media, da un numero inferiore di alleli per locus. Tale pattern è congruente con uno scenario di ridotta possibilità di scambio genico nelle popolazioni periferiche dell'areale rispetto a quelle più

centrali. Nelle popolazioni periferiche ci si attende infatti che, per effetto della deriva genica, possano essere più facilmente persi alleli che non vengono “rimpiazzati” da alleli provenienti da popolazioni limitrofe, come invece avviene nelle parti più centrali dell’areale. Ciò è confermato anche dalla minore frequenza di loci polimorfici nelle popolazioni periferiche dove il flusso genico contrasta in modo meno efficace fenomeni di riduzione della diversità genetica come la deriva ed il bottleneck. Anche effettuando una stima dell’allele richness, stima standardizzata della ricchezza allelica per locus rispetto alle dimensioni delle popolazioni (calcolata assumendo che la popolazione più piccola fosse costituita da 7 individui) ha confermato che il trend osservato nella variabilità allelica dei loci esaminati è indipendente dalle dimensioni del campionamento.



Le popolazioni, inoltre, sono state sottoposte ad analisi per valutare l’eventuale presenza di alleli privati, come indice di diversità tra le popolazioni. Non sono stati trovati alleli privati (esclusivi) di una singola popolazione anche se sono stati trovati sporadicamente in alcune popolazioni dei rari alleli molto divergenti. Questi 8 alleli privati riscontrati, però, più che essersi evoluti in loco sembrano riconducibili a fenomeni di ibridazioni con il platano stradale (i.e. ibridi *Platanus x acerifolia*) come confermato dal fatto che questi alleli sono stati ritrovati con frequenza negli individui *Platanus occidentalis* ed individui di platano “stradale” *Platanus x acerifolia* analizzati per riferimento.

Pop	Locus	Allele	Freq
ALE	Locus1	184	0,016
ALE	Locus3	277	0,004
ALE	Locus3	373	0,004
ALE	Locus6	224	0,004
ACHE	Locus7	216	0,011
ACHE	Locus7	228	0,011
DRINO	Locus3	267	0,030
MIK	Locus3	275	0,045

Questi alleli “estranei”, frutto di sporadica ibridazione tra platano coltivato e spontaneo sono stati ritrovati in popolazioni nella cui prossimità sono frequenti gli impianti di platano coltivato, in particolare nel bacino dell’Alento, caratterizzato da una notevole presenza antropica in stretta connessione con gli insediamenti di platano spontaneo.

La popolazione dell’Alento, come è evidente dalla tabella sottostante, è quella che ha mostrato il valore più basso di eterozigosità osservata con un valore di H_o pari a 0.155, mentre la popolazione che ha evidenziato il valore più alto di eterozigosità osservata è la popolazione Cretese con un valore di H_o pari a 0.542. Tutte le altre popolazioni mostrano valori di H_o compresi tra 0.210 e 0.532, parimenti, le analisi di eterozigosità osservata ed attesa hanno evidenziato che la popolazione con il più basso valore di eterozigosità attesa è la popolazione Ale (Campania), con un valore di H_e pari a 0.295. La popolazione Cretese con un valore di H_e pari a 0.530 è invece quella che ha mostrato il valore più alto; tutte le altre popolazioni hanno mostrato livelli di eterozigosità attesa variabili tra 0.311 e 0.468. Quindi c’è sostanziale accordo tra H_o ed H_e nell’indicare la popolazione dell’Alento come quella con i più bassi valori di eterozigosità e, di riflesso, con i valori più alti di omozigosità. La spiegazione più plausibile per il pattern osservato per la popolazione dell’Alento è nelle sue ridotte dimensioni ed estrema perifericità nell’areale che ne riduce le possibilità di scambio genico.

		Ho	He			Ho	He
ALENTO	MEAN	0.15541	0.29551	AOOS	MEAN	0.28077	0.39783
	S.D.	0.07865	0.16796		S.D.	0.21349	0.15873
CALABRIA	MEAN	0.36000	0.33796	OSUM	MEAN	0.34524	0.36243
	S.D.	0.37417	0.23144		S.D.	0.16547	0.19993
ALCANTARA	MEAN	0.38095	0.32234	DRINO	MEAN	0.24242	0.39174
	S.D.	0.26599	0.19776		S.D.	0.18097	0.24732
ANAPO	MEAN	0.36757	0.32447	KRESNA	MEAN	0.47143	0.46842
	S.D.	0.32969	0.18339		S.D.	0.20587	0.19374
CATALDO	MEAN	0.41250	0.42115	TOPOLOVO	MEAN	0.42381	0.44132
	S.D.	0.11087	0.11207		S.D.	0.23705	0.22385
MANGHISIO	MEAN	0.45833	0.39130	MIKREVO	MEAN	0.42857	0.46568
	S.D.	0.37577	0.17802		S.D.	0.23888	0.22773
CRETA	MEAN	0.54278	0.53080	DARDANELLI	MEAN	0.53247	0.45887
	S.D.	0.12538	0.15768		S.D.	0.24857	0.22748
NESTOS	MEAN	0.32857	0.45188	BESKONAK	MEAN	0.41071	0.39405
	S.D.	0.11127	0.15881		S.D.	0.35878	0.20676
ACHERONTE	MEAN	0.21042	0.31123				
	S.D.	0.19108	0.26566				

Il coefficiente di inbreeding F_{is} è stato stimato per tutte le popolazioni locus by locus e laddove sono indicati valori negativi, questi stanno ad indicare un eccesso di eterozigoti; laddove il valore non è stato assegnato vuol significare che il locus, per quelle popolazioni, è monomorfo. La popolazione dell'Alento, assieme a quella di Drino hanno i valori di inbreeding più alto. In presenza di inbreeding si ha una riduzione della diversità allelica, a causa del modesto pool genico degli individui componenti la popolazione. Questa condizione viene accentuata in caso di assenza di flusso genico (assenza di immigrazione) come già ipotizzato proprio per la popolazione dell'Alento. E' infatti evidente che un elevato livello di omozigosi si correla ad un elevato livello di inbreeding.

Locus	Average FIS	Alento	Calabria	Cat	Man	Alc	Ana	Creta	Nes	Kre	Top	Mik	Dar	Bes	Drino	Osum	Aoos	Ache
1	-0.26496	0.10838	-0.92000	-0.26667	-100.000	-0.50000	-0.84615	-0.25581	0.25000	-0.04651	-0.36957	-0.05263	-0.42857	0.54839	0.00000	-0.10976	-0.55556	0.10105
2	-0.18257	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-0.29341	-0.12500	-0.20000	-0.12500	-0.11111	0.00000	-0.07692	0.00000	-0.04000	-0.07692	-0.00000
3	0.18954	0.35200	0.21204	0.00000	N.A.	-0.06667	0.03193	-0.25145	0.10891	-0.26000	-0.06931	0.44444	-0.27273	100.000	0.43571	0.07143	0.43503	0.30956
4	0.29950	0.52943	N.A.	N.A.	-0.04762	0.00000	-0.01408	0.02878	-0.05882	0.08163	0.10000	0.31973	-0.25000	-100.000	0.63289	-0.01961	0.59223	100.000
5	0.32782	0.68088	-0.00000	N.A.	N.A.	0.00000	N.A.	-0.02768	0.61702	-0.00000	-0.05882	0.00000	-0.12676	0.00000	0.38697	-0.18182	0.52273	0.29176
6	0.36187	0.53574	0.66197	0.11833	0.23611	0.00000	0.09758	0.25160	0.20879	0.31429	0.64000	-0.06195	-0.08527	-0.27273	0.64246	N.A.	0.64103	0.38571
7	0.32440	0.51855	-0.09091	0.20168	0.28261	-0.23077	0.36508	0.14122	0.52632	-0.02439	0.21311	-0.09756	-0.00559	-0.07692	0.38249	0.29730	0.45455	0.41430

La misura della differenziazione delle popolazioni, come proporzione della diversità totale, è stata calcolata attraverso i seguenti indici di differenziamento: il coefficiente F_{st} di Weir &

Cockerham e il valore di G_{st} di Nei. I valori medi per tutte le popolazioni sono $F_{st} = 0,268$ e $G_{st} = 0,241$. Questi valori sono abbastanza elevati ma va tenuto conto che si riferiscono ad un areale ad ampia distribuzione per cui potrebbero risentire dell'elevata distanza tra popolazioni isolate. A tal fine sono state effettuate comparazioni di differenziamento genetico tra popolazioni con differenti livelli di distanza geografica (Fig. 19).

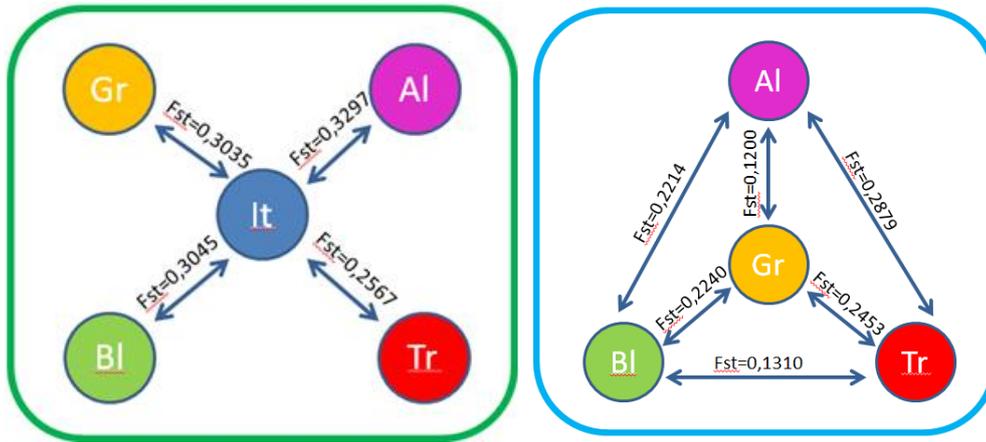


Figura 19 Stima del valore F_{st} tra popolazione italiane greche e balcaniche con un'ampia distanza geografica e tra popolazioni greche e balcaniche con un'inferiore distanza geografica.

Le principali aree geografiche sono caratterizzate da una notevole differenziazione genetica ad indicazione che esiste una ridotta dispersione a lunga distanza e che queste aree geografiche sono state soggette ad isolamento per un periodo di tempo prolungato. Ciò è in accordo con le caratteristiche di platano orientale come specie relitta nel bacino del Mediterraneo.

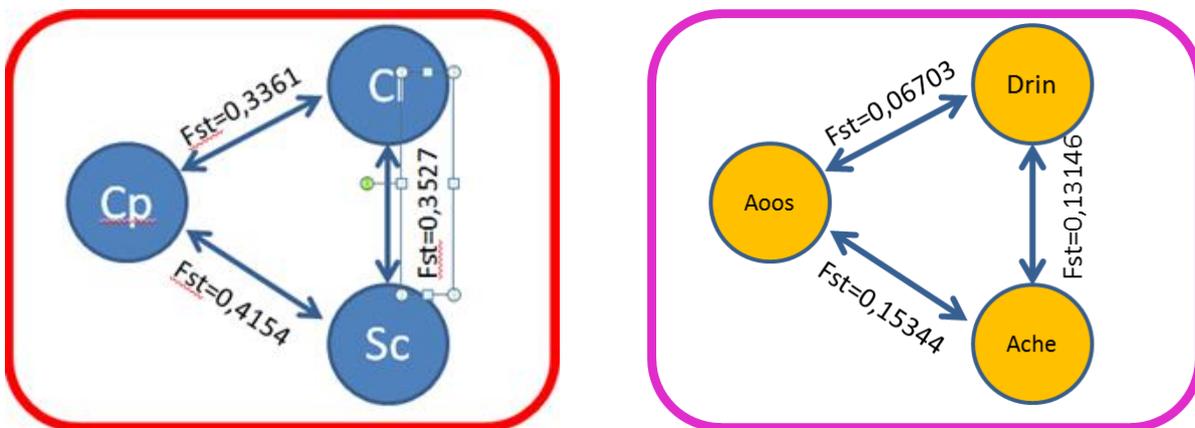


Figura 20 Stima del valore F_{st} tra popolazioni con simile distanza geografica.

Però, confrontando la differenziazione genica tra popolazioni appartenenti alla stessa area geografica, come quelle italiane e greche (Fig.20), si può osservare che a differenza delle popolazioni greche, caratterizzate da minore differenziazione e quindi da livelli maggiori di flusso genico, le popolazioni italiane sono molto più isolate su scala geografica comparabile a quella greca. Il ridotto flusso genico delle popolazioni lungo la penisola italiana può essere spiegato sia dalla disposizione geografica (nord-sud) sia da una minore connettività data dall'assenza di popolazioni intermedie, come invece accade per le popolazioni più centrali nell'areale di distribuzione.

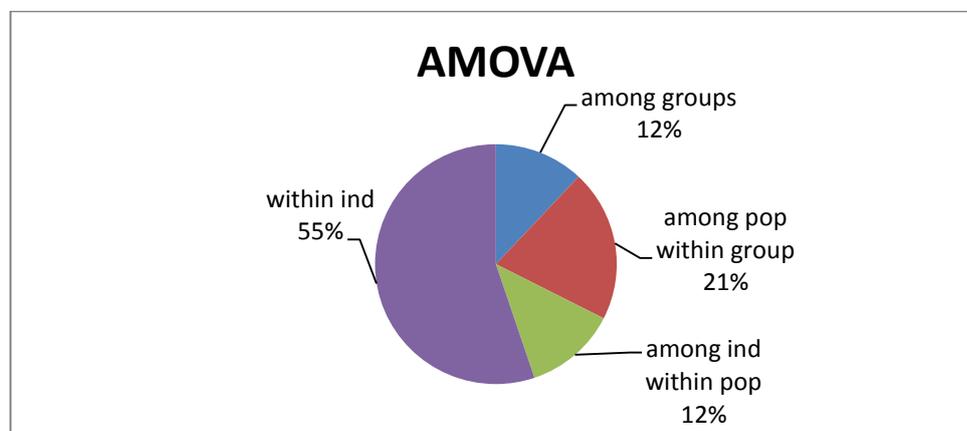


Figura 21 Analisi della varianza molecolare, effettuata con il software Arlequin 3.5.

Anche l'analisi AMOVA (Fig. 21), che mostra la percentuale della variabilità genetica dovuta alle variazioni inter ed intra popolazionali, evidenzia una notevole quota di variabilità genetica tra i gruppi di popolazioni e tra le popolazioni nei gruppi, ad indicazione di un certo grado di isolamento geografico, particolarmente elevato nelle zone periferiche dell'areale come l'Alento.

Per verificare se la distanza geografica fosse il fattore principale a determinare lo scambio genico tra le popolazioni, e quindi, se popolazioni vicine scambiano più facilmente tra loro che non con popolazioni lontane, è stato eseguito il Mantel test (Fig. 22). L'analisi ha confermato

che la distanza geografica ha un ruolo importante nel determinare il flusso genico tra le popolazioni.

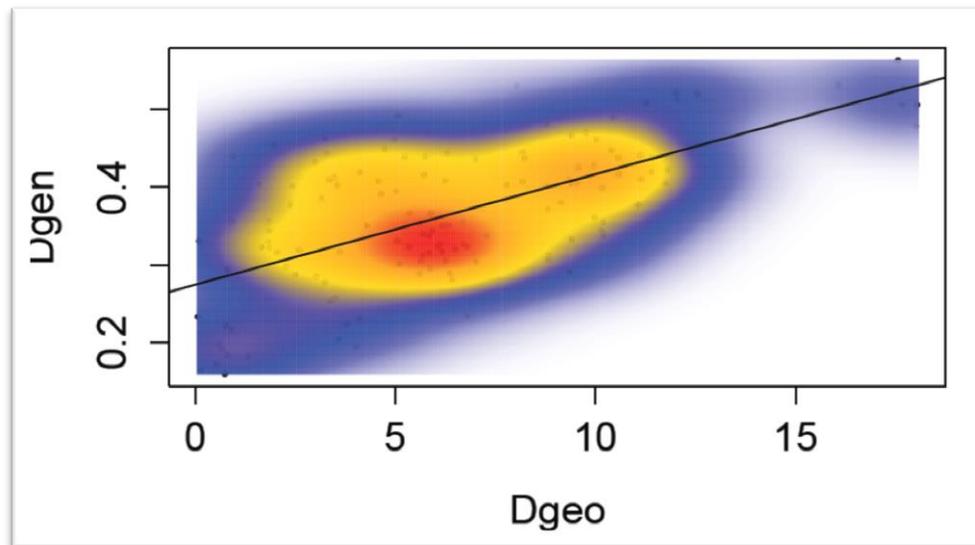


Figura 22 Analisi Mantel test effettuata con il software R 2.15.1. Correla la distanza genetica basata sui valori linearizzati di F_{st} con il logaritmo naturale delle distanze geografiche.

E' stata inoltre condotta anche un'altra analisi, Special PCA, con il software R, che correla i dati della PCA alle coordinate geografiche. A tal fine è stata preliminarmente effettuata l'analisi delle componenti principali (PCA) con il programma R (Fig. 23) considerando solo i valori delle distanze genetiche.

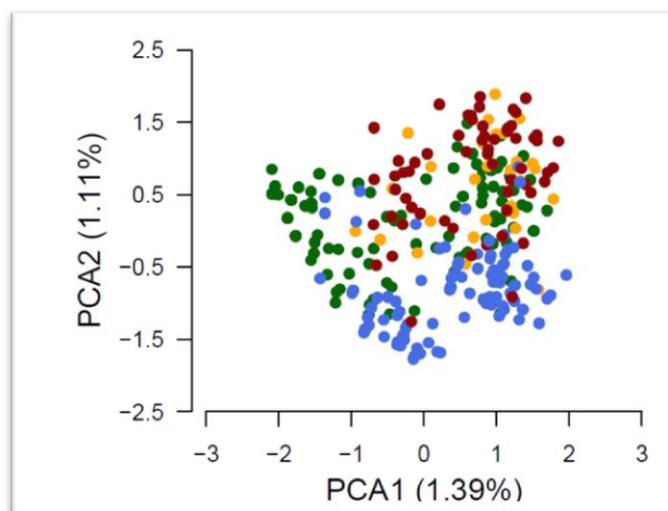


Figura 23 Analisi delle componenti principali (PCA), effettuata con il software adegenet package for R 2.15.1, basata sulle frequenze alleliche per ogni popolazione.

Dall'immagine della PCA le popolazioni colorate di verde rappresentano quella italiana, in azzurro le greche, in bordeaux, le turche e le bulgare con la popolazione di Nestos (Grecia) che è, geograficamente, molto vicina ad esse. Infine col colore arancione sono identificate le popolazioni cretesi.

A questo punto, i valori ottenuti dalla PCA su base genetica, sono stati correlati con le distanze geografiche (Fig. 24). La variazione dei colori, che è possibile osservare nell'immagine sono in relazione ai valori assegnati sull'asse delle ascisse X.

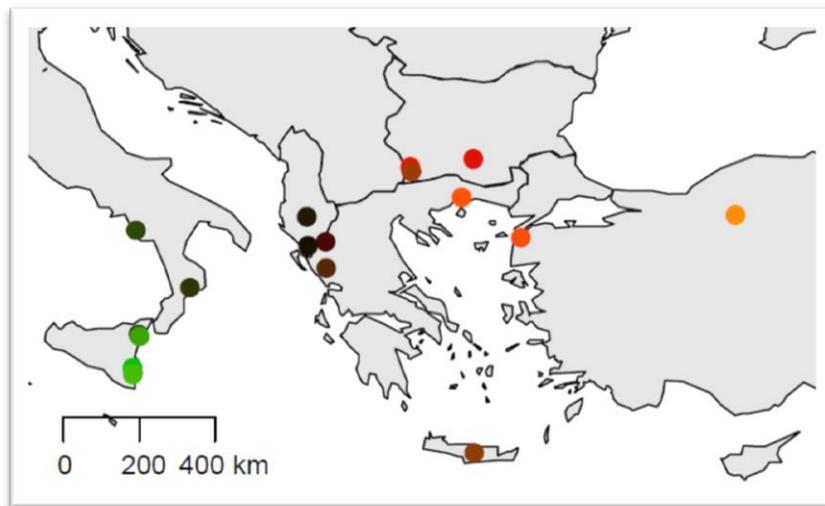


Figura 24 Special Pca, i valori delle distanze genetiche sono state correlate alle distanze geografiche. Le sfumature di colore raggruppano popolazioni che presentano similarità.

Infine è stata condotta anche un'altra analisi, con il software R, in cui sul grafico della PCA vengono riportate le connessioni geniche tra le popolazioni e delle possibili barriere al flusso genico, rappresentate con una linea nera (Fig. 25). In questo caso il colore delle popolazioni riflette la loro possibile connessione. Il risultato è congruente con precedenti ipotesi biogeografiche sulle specie vegetali nel Mediterraneo che hanno frequentemente evidenziato una demarcazione abbastanza netta tra la Grecia continentale ed insulare. Meno chiara appare invece la demarcazione tra Italia meridionale e Sicilia, con quest'ultima più affine alle popolazioni insulari/Europa orientale che alla Grecia continentale. Questo implicherebbe che

mentre le popolazioni dell'Italia peninsulare, in particolare quella calabrese, sono più affini alla Grecia continentale quelle della Sicilia sono principalmente in connessione con il bacino est-Mediterraneo.

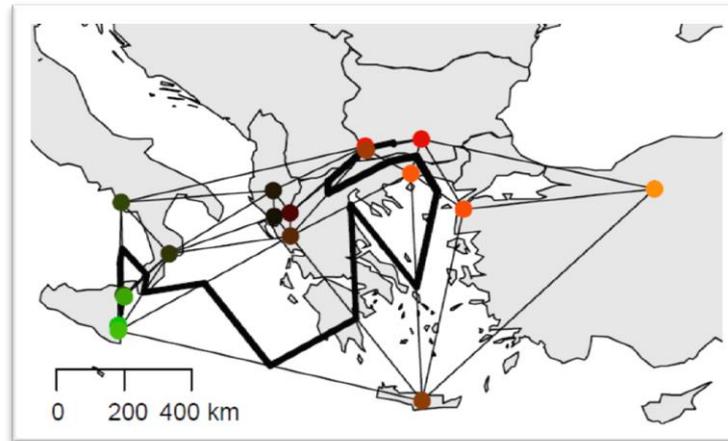


Figura 25 Special Pca, effettuata con il software R in cui sono state riportate le possibili barriere al flusso genico.

Una matrice di distanze genetiche tra popolazioni usando la distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards è stata ottenuta con il software R e un dendrogramma neighbour-joining è stato realizzato con Mega 5.1. (Fig. 26). Tale analisi supporta le analisi precedenti ed evidenzia dei gruppi di popolazioni identificabili anche su un piano geografico. In particolare è interessante notare, che, rispecchiando i risultati ottenuti dalla PCA:

- La popolazione calabrese ha una posizione intermedia tra la Grecia e l'Italia. Le popolazioni siciliane sono vicine a quelle della Grecia insulare;
- La popolazione greca di Nestos, si raggruppa con le popolazioni geograficamente vicine della Bulgaria e della Turchia demarcando una chiara separazione con le popolazioni della Grecia continentale/Albania;
- Creta è in connessione con la Grecia orientale piuttosto che con quella continentale.

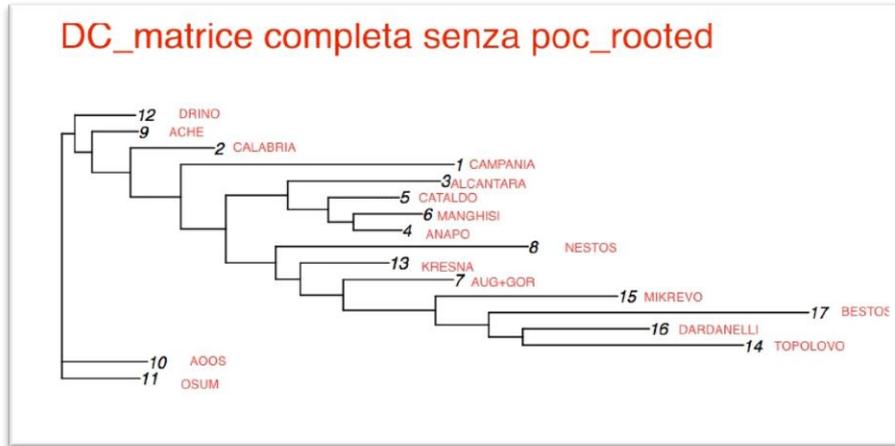


Figura 26 Dendrogramma neighbour-joining realizzato con Mega 5.1.

In alternativa ad un approccio di verosimiglianza si è anche utilizzato un approccio bayesiano di attribuzione delle popolazioni. In questo caso l'identificazione della struttura delle popolazioni è stata condotta col software Structure. Per determinare il numero ottimale di cluster, abbiamo calcolato la probabilità media di ogni K, 'log di probabilità' (LNP (D)), attraverso tutte le possibili interazioni come suggerito da Pritchard et al.(2000) e la statistica Delta-K secondo Evanno (2005). Questa analisi indica k=3 come scenario più probabile per la suddivisione dei gruppi (Fig. 27).

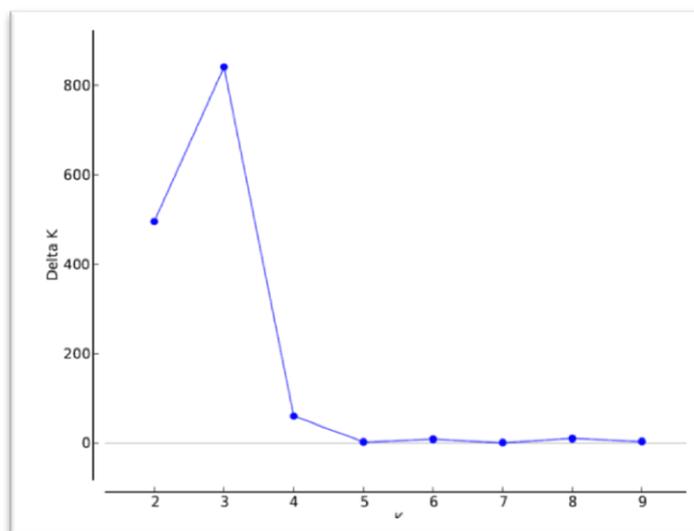


Figura 27 Statistica Delta K che utilizza il metodo Evanno.

Con tale suddivisione si identificano tre raggruppamenti principali (Fig. 28):

- Alento;
- Grecia continentale + Calabria;
- Grecia orientale+Bulgaria+Creta+ Turchia.

Le popolazioni siciliane hanno attribuzione intermedia tra Grecia continentale e orientale/Creta con chiara prevalenza di quest'ultimo gruppo.

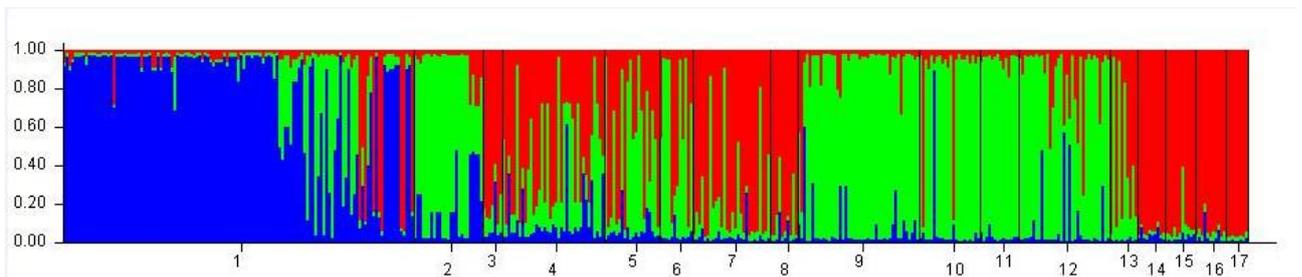


Figura 28 Analisi Bayesiana(Structure) che permette di classificare gli individui in cluster a partire dai loro genotipi multilocus. In blu è rappresentata la popolazione dell'Alento(1), in verde le popolazioni della Calabria (2) e Grecia continentale (da 9 a 12) e in rosso le popolazioni della Grecia orientale(7), Bulgaria (13,14,15), Creta(8), Turchia(16,17) e Sicilia(da 3 a 6).

Dalla rappresentazione di Structure si denota che la popolazione dell'Alento presenta una certa demarcazione interna. Effettuando un' analisi con Geneland, per comprendere meglio questa suddivisione interna all'Alento, si evidenzia un isolamento abbastanza marcato tra i vari bracci del bacino fluviale, con una parte della popolazione caratterizzata da una notevole diversità genetica rispetto al resto (Fig. 29). Non è chiaro se tale differenza, supportata anche da un inusuale eccesso di omozigoti in tale gruppo di individui, possa essere spiegata in termini di intervento antropico con successiva introduzione e coltivazione del platano in questa specifica area.

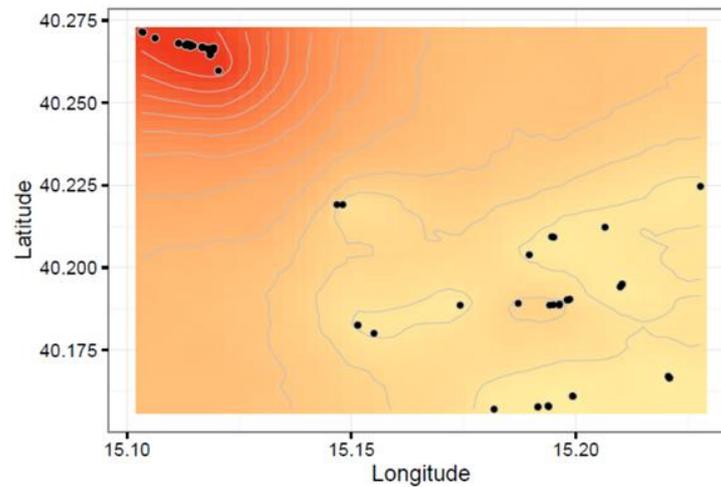


Figura 29 Risultato dell'analisi Geneland riguardante la popolazione dell'Alento (Campania).

Per cercare di comprendere al meglio la situazione delle popolazioni dell'Alento, in particolare, per la popolazione in cui abbiamo riscontrato un eccesso di omozigoti, abbiamo analizzato dei campioni d'erbario del 1800 provenienti proprio da quella specifica area geografica. Dall'analisi delle frequenze alleliche dei campioni d'erbario analizzati si evidenzia però una maggiore corrispondenza di essi con le popolazioni dell'Alento non omozigoti (Fig. 30) piuttosto che con quella appartenente ad un altro braccio del fiume Alento caratterizzata da una elevata percentuale di individui omozigoti; pertanto continuano a persistere dubbi sull'origine di questa popolazione.

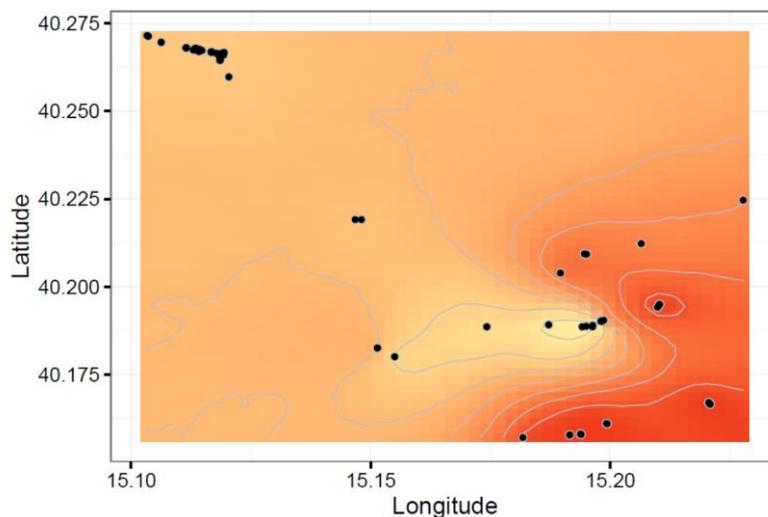


Figura 30 Analisi con software Geneland in cui si evidenzia che le frequenze alleliche dei campioni d'erbario sono più simili alle popolazioni dell'Alento in cui non si evidenzia un eccesso di individui omozigoti.

Alla luce di questo risultato è stata effettuata una nuova analisi con Structure (Fig. 32) ma eliminando la sottopopolazione omozigote dell'Alento. Per determinare il numero ottimale di cluster, abbiamo calcolato la statistica Delta-K secondo Evanno (2005). Questa analisi indica $k=2$ come scenario più probabile per la suddivisione dei gruppi (Fig. 31)

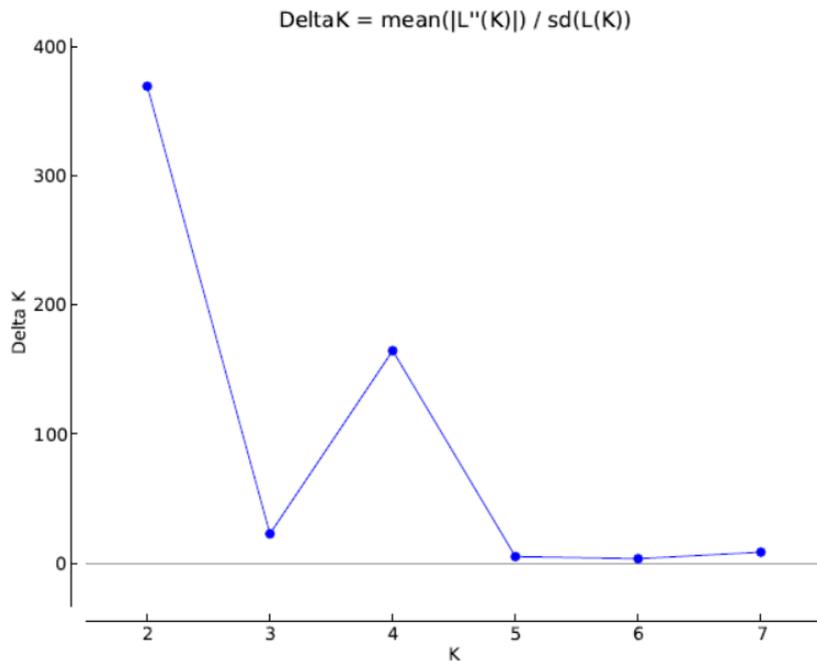


Figura 31 Statistica Delta K che utilizza il metodo Evanno.

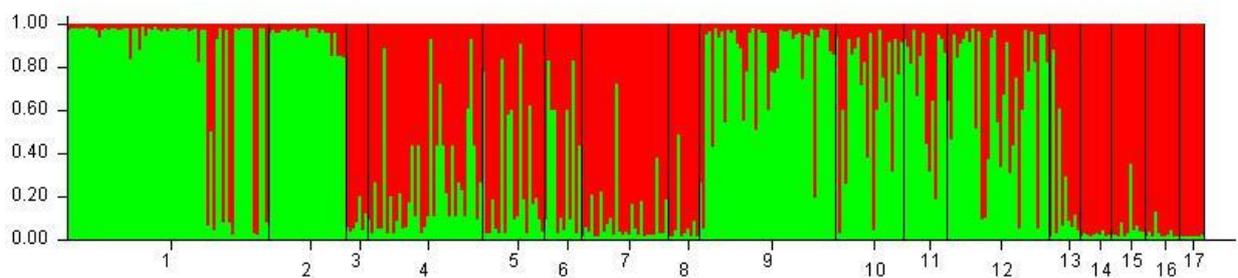


Figura 32 Analisi Bayesiana (Structure) con K uguale a 2

Da questo risultato si evince che le rimanenti popolazioni dell'Alento si raggruppano insieme alla Gecia continentale e alla Calabria.

ANALISI DI PATERNITA'

La capacità di scambio genico tra le popolazioni è stata anche verificata indirettamente mediante analisi di progenie. In particolare, sono stati eseguiti dei test di paternità su semi di piante provenienti dall'Alento e dalla Sicilia. L'analisi è stata effettuata utilizzando solo due marcatori dei sette loci a disposizione, il 68 Fam e il 176 Atto 565: questo perché, i suddetti loci, erano gli unici sufficientemente polimorfici per poter individuare eventuali alleli paterni. Noto il genotipo della pianta madre è possibile identificare uno dei due alleli presenti nella progenie. I rimanenti alleli nella progenie possono essere o differenti o uguali alla pianta madre, nel caso in cui i padri avessero lo stesso allele o un allele differente. In totale sono state analizzate 239 plantule dell'Alento (Campania) germinate da circa 1400 semi piantati e 101 plantule provenienti da Cataldo e Alcantara (Sicilia) germinate da circa 700 semi piantati, per un totale di 340 individui. Le analisi di paternità sono state condotte, a partire da prodotti di amplificazione del DNA parentale della madre e della progenie, non essendo noto il donatore di polline. I frammenti sono stati corsi tramite elettroforesi capillare e sono stati poi analizzati utilizzando il software Gene Mapper v3.7 (Applied Biosystems).

Attraverso il genotipo materno come da tabella, è stato possibile riscontrare l'effettiva relazione di paternità.

	68FAM	176ATTO565
ALENTA	170/170	273/273
CATALDO	170/170	269/269 271/271
ALCANTARA	170/170 170/176	269/271 271/271

Gli individui che hanno mostrato un solo picco, sono omozigoti, per il corrispondente microsatellite, mentre gli individui che hanno mostrato due picchi sono eterozigoti (Fig. 33). Confrontando l'assetto allelico della pianta madre con quello dei figli, nei due loci in esame, è stato possibile stimare il numero di padri e stabilire quindi la possibilità di scambio genico tra popolazioni.

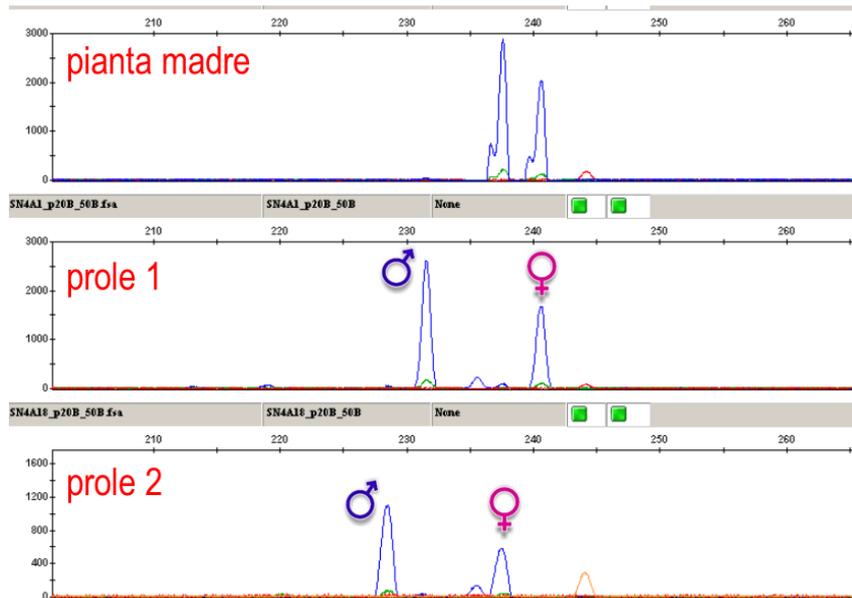


Figura 33 Analisi di paternità su *Platanus orientalis*.

La pianta madre dell'Alento deriva da un gruppo di individui tutti geneticamente omogenei per cui, qualsiasi allele trovato nella progenie, e che non fosse presente anche nella pianta madre, poteva solo essere derivato da individui lontani (appartenenti ad altri bracci del fiume). In questo caso, dallo screening microsatellitare delle 239 plantule, in due soli casi abbiamo ritrovato un allele non appartenente alla madre (o agli alleli locali). In entrambi i casi però si trattava di alleli di provenienza dall'ibrido stradale *Platanus x acerifolia* molto comune in zona. La bassa variabilità allelica tra i diversi rami fluviali dell'Alento non ci permette di escludere che polline (recante gli stessi alleli della pianta madre) possa essere giunto da individui distanti, ma sembra improbabile, che nella progenie non si sia trovato nessun allele diverso da quelli presenti nel gruppo di individui nelle immediate prossimità della pianta madre. Va anche

sottolineato che gli individui più prossimi a questa pianta madre, escludendo i suoi consimili, fossero proprio individui di platano ibrido piantato lungo le strade circostanti. Tale risultato anche se parziale e limitato lascia pensare che non vi sia scambio genico tra questa e le altre popolazioni dell'Alento, e che sono presenti quasi esclusivamente fenomeni di incrocio tra individui molto vicini.

A differenza delle popolazioni dell'Alento, le popolazioni siciliane sono caratterizzate da maggiore omogeneità allelica quindi non è possibile utilizzare i test di paternità per individuare flusso pollinico da individui appartenenti a gruppi differenti. Comunque, la stessa analisi effettuata su progenie di semi siciliani, ha evidenziato che semi provenienti dallo stesso frutto sono spesso derivati da impollinazione di padri differenti.

Library Microsatellitare

Il sequenziamento della library arricchita di microsatelliti è stata effettuata con un sequenziatore Illumina MiSeq in modalità paired-end sequencing. Il sequenziatore ha prodotto un totale di 85150 reads (sequenze).

I files fastq ottenuti dal sequenziatore MiSeq sono stati ripuliti dagli adattatori con il programma Fastx Toolkit http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/ e successivamente è stato effettuato il controllo di qualità per ciascun file fastq.

Fastx Toolkit è un pacchetto di programmi che consente di modificare file fasta e fastq prima di analizzarli. Questo è possibile con Fastx Toolkit, ad esempio, selezionare le reads con maggiore qualità, tagliarle, eliminare gli adattatori, trasformare un file fastq in fasta o fare tante altre operazioni che ci consentono di pre-processare il file per migliorare il risultato finale e ridurre i falsi positivi.

Nel primo step di analisi i dati derivanti dal sequenziamento sono stati sottoposti al controllo di

qualità, mediante l'utilizzo del tool bioinformatico FastQC del Babraham Institute.

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

I report ottenuti da questa prima analisi indicano che la maggior parte delle reads presentano una perdita di qualità oltre i 200 nucleotidi (Fig. 34).

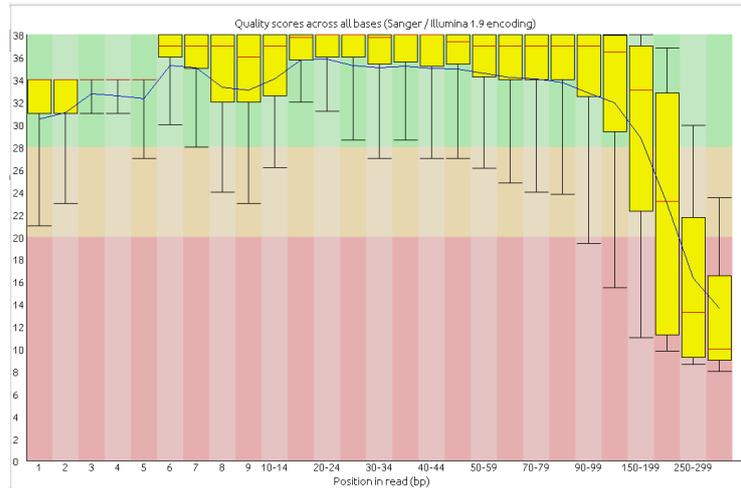


Figura 34 FastQC report, mostra come la qualità delle reads diminuisce oltre i 200 nucleotidi

Per assemblare le reads "forward" e "reverse" del sequenziatore Illumina è stato utilizzato il programma "FLASH" (Fast Length Adjustment of SHort reads) paired-end assembler del "The Center for Computational Biology at Johns Hopkins University".

<https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>

FLASH richiede in input due files fastq generati da un sequenziamento effettuato in modalità paired-end. Quando la sovrapposizione è corretta, le due reads vengono assemblate, producendo una sequenza estesa che corrisponde alla lunghezza del frammento di DNA originale. Questo programma consente di assemblare le reads grazie ad un algoritmo di allineamento e genera in output tre file: un file che riporta solo le sequenze che sono state assemblate grazie alla sovrapposizione dei nucleotidi presenti alle estremità della sequenza "forward" e "reverse", un altro file contenente le sequenze "forward" non assemblate e un altro per le "reverse" non assemblate. FLASH consente di modificare inoltre il grado di match e

mismatch e di indicare il numero minimo e massimo di nucleotidi da sovrapporre durante l'allineamento necessari per assemblare le sequenze.

Successivamente è stato usato il programma "Fastx quality filter" del pacchetto "fastx toolkit". Questo programma è capace di filtrare le sequenze con la migliore qualità sfruttando il punteggio Phred. Il punteggio Phred è una misura della qualità del singolo nucleotide che viene assegnata dal sequenziatore durante il sequenziamento del DNA.

Il programma è stato settato in modo tale da filtrare solo le sequenze con un Phred di almeno 20. Un punteggio Phred di 20 corrisponde ad avere la certezza che circa il 99% dei nucleotidi sono corretti, come illustrato dalla tabella.

Phred Quality Score	Probability of incorrect base call	Base call accuracy
10	1 in 10	90%
20	1 in 100	99%
30	1 in 1000	99.9%
40	1 in 10,000	99.99%
50	1 in 100,000	99.999%
60	1 in 1,000,000	99.9999%

Dopo aver filtrato il file fastq, esso è stato poi convertito in formato fasta con il programma "fastx toolkit" usando il comando `fastq_to_fasta`.

Per ricercare le sequenze ripetute nel file fasta contenente la library di microsatelliti, è stato usato il programma "Tandem Repeats Finder" (TRF). Tandem Repeats Finder ricerca microsatelliti allineando le sequenze nel file fasta contro un database di sequenze ripetute chiamato "Tandem Repeats Database". Per effettuare un allineamento migliore, Tandem Repeats Finder richiede in input un valore relativo al peso del match, mismatch e indels. Inoltre TRF richiede che venga specificato in input la lunghezza del repeat e del microsatellite. Il programma, infatti, è stato impostato in modo tale da ricercare microsatelliti con almeno 15

I primers sono stati disegnati usando un altro script in linguaggio perl. Questo script usa moduli di BioPerl: Bio::Tools::Run::Primer3 e Module::Bio::SeqIO. BioPerl è un insieme di moduli Perl che semplificano lo sviluppo di script Perl per le applicazioni bioinformatiche. http://www.bioperl.org/wiki/Main_Page.

Primer3 è un programma capace di disegnare primer per Reazione a Catena della Polimerasi (PCR). Questo programma richiede diverse informazioni che devono essere obbligatoriamente specificate dall'utente, come ad esempio: temperatura di fusione di oligonucleotidi, dimensione, il contenuto in GC, o dimensione del prodotto di PCR.

```
*PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM07:1:1101:21430:19940
SEQUENCE_TEMPLATE=CATGAGTCTGAGTAAACACTGGCTGGGATTGAACTAAGCCCGAACATAGCAAGCACCTCAAGATTACCAATAAAAAATCCTTTGCCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGAG
>PRIMER_MIN_TM=60
>PRIMER_MAX_TM=70
>PRIMER_MIN_SIZE=18
>PRIMER_MAX_SIZE=24
>PRIMER_MIN_GC=30
>PRIMER_MAX_GC=60
>PRIMER_SELF_ANY=0
>PRIMER_GC_CLAMP=3
>PRIMER_MAX_DIFF_TM=10
>PRIMER_MAX_POLY_X=3
>PRIMER_MAX_END_STABILITY=100
>PRIMER_NUM_RETURN=3
TARGET=100, 200
>PRIMER_PRODUCT_SIZE_RANGE=150 - 300
>PRIMER_LEFT_NUM_RETURNED=3
>PRIMER_RIGHT_NUM_RETURNED=3
>PRIMER_INTERNAL_NUM_RETURNED=0
>PRIMER_PAIR_NUM_RETURNED=3
>PRIMER_PAIR_0_PENALTY=4.713016
>PRIMER_LEFT_0_PENALTY=1.340991
>PRIMER_RIGHT_0_PENALTY=3.372025
>PRIMER_LEFT_0_SEQUENCE=TGGCTGGGATTGAACTAAGCC
>PRIMER_RIGHT_0_SEQUENCE=AGGATGGGTAGAAAGATTGTGCC
>PRIMER_LEFT_0=20,21
>PRIMER_RIGHT_0=197,23
>PRIMER_LEFT_0_TM=60.341
>PRIMER_RIGHT_0_TM=60.372
>PRIMER_LEFT_0_GC_PERCENT=52.381
>PRIMER_RIGHT_0_GC_PERCENT=47.826
>PRIMER_LEFT_0_SELF_ANY_TH=5.22
>PRIMER_RIGHT_0_SELF_ANY_TH=0.00
>PRIMER_LEFT_0_SELF_END_TH=5.22
>PRIMER_RIGHT_0_SELF_END_TH=0.00
>>>END OF TARGETS
```

Figura 36 Output dello script che disegna primers usando il programma primer3.

I parametri impostati per primer3 sono TM minima 60 e massima 70, lunghezza primer minima 18 e massima 24, quantità di GC minima 30 e massima 60 (Fig. 36).

Successivamente è stato usato il software BLAST per confrontare i primers selezionati dal programma primer3 all'interno dell'intera sequenza, in modo tale da essere certi che i primers forward e reverse disegnati, siano specifici solo di un'unica regione della sequenza evitando

così la formazione di altri prodotti di amplificazione non specifici della regione microsatellitare in esame.

Dall'assemblamento, in forward e reverse, delle 85150 reads ottenute, al momento abbiamo selezionato circa 30 nuovi loci microsatellitari, di seguito riportati, da poter utilizzare in successivi studi sulla diversità genetica del Platano.

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:2111:23612:16793
 SEQUENCE_TEMPLATE=TATGAGTCCTGAGTAAAGTTACCTAGTGCTTGCCAGAGCCATGCCTCCACAAGTTGGG
 ATGAAGTTACAATTTTGGTAGGGCTTGAGTCTTGACCATAGCCATGGTGGTA**GAGAGAGAGAGACAGAGAGAGAGAG**
AGAGAGAGAGAGAGAATGATTTTCTCAAGAATAGTTTGCCAAGTATCATGAGAAAACCAACCTATTTTAGCATTTCAG
 ACAGGGCATAGTTACTCAGGCTCATC

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:1102:9915:13130
 SEQUENCE_TEMPLATE=TATGAGTCCTGAGTAAATCCGTC AATCCATACATGCATGATTCGCTTTTGATCGTAAGG
 TCAGACCCAGTCTAAACTCCAAATGTGACTCGTAACTTCTTGAAG**GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT**
GTGTCACGTACCTCACTGTGGAACGGTAAACCAATGTTGGTACCACAGAAATCTAAAATGTCACCACCTGCTGTTGT
 ACTTACTCAGGACTCATCGTCATGCGGATATTGGTCACGAAATCTGTTGTGACTTCATG

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:1107:15123:23064
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATGAGTCCGAGTAAAAGTGACAAAATTCAACTTGTGCTCCAGTACTTGCGCACACCAT
 AGTAGGGCTATACATCTCTATACTTTACTCAGTGTAAT**GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT**CACCTC
 CTCAGGTGACATGTGAGCGAGTAGTTTCCACACAGGCTTATTTTTCACACTTTGCCACCGGTCCCACTGCGTTAC
 TCAGGACTCATC

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:1108:14083:14208
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATGCGTCCTGAGTAAAGCATTAGGCTACTCAGTTGAATTGTGTGCTTTTCTATCAATA
 CCACCATCAGCTCCTCATGCATCAAGGCAGGCCCAATACGCTGAG**CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT**
CCCTCTCTCTTTGATGCACGTGGCGCCACATATGGTCTTGCGGAGTCTACATGAAGATTTATGGAGGAACGCTTA
 GTTACTCAGGACTCATCCTGTCTCTTATCACATCTCCG

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:1114:16745:9607
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATGAGTCCTAAGTAAAATTACGAGACTAACTCATTCAAGCCCTTTTCTAGATCTGCA
 ATGAACTCATAACAACCATCCCAAGTTATGCACCATTTGGGACATGCTTGTCTA**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**
TGTGTGTGTGTGTTTCCGCTTTTGAATTGCCATTAGTAAAATAGAAGCCAGTGTTACTCAGGACTCATCCTGT
 TCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGACTAAGGCGACT

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:2106:21931:13657
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATGAGTCCTGAATAAAGGTATGTTTCGTCGAGCAACAACAATAACACGCCACGCTTA
 TTTATACCATCCATGAGTGTGAGCAGCTGA**CACACACACACACACACACACACACACACACA**TATTACTAGAAAGGATG
 GTTCCTTGCTGGCTCGAATTGGTTTACGATTACATATCTCTACCAAAATTTACATAAATTTGGTTACTCAGGACTCAT
 CCTCT

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:2116:20232:16175
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATTAGTCCTGAGTAAAGGAAATCCCACCTTGCCCTTACTCTCATTGAGTGTTATCAGGA
 TAAGGTACATAGCTTTGTTTTAGCTTTCTAAGTTCTACA**TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT**CATGAC
 CTAGAATCTGAATCTCTTTGTTACTCAGGACTCATCCTGTCTCTTATACAATCTCCGAGCCCACGAGAATAAGGCGA
 ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGAAACAAAAAAC

PRIMER_SEQUENCE_ID=M01598:156:000000000-AHM67:1:2119:9934:10921
 SEQUENCE_TEMPLATE=GATGAGTCCTAAGTAAAAGAAATAAATCAGTGGTGGAGGATGAGTCTGTAAATACATCC
 ATAAAGCCCGATAATGCTCACGGTATGCGT**TGTGTGTGTGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTGTGTGTG**CGC
 AGGCCATCTACAAATTTGTCATTTGACCTATAAAATTTATATCGTTACTCAGGACTCATCCTGTCTTTATACACATCTC
 CGAGCCCACGAGACTAAGGCGAATCTAGTATGACGTCTT

ANALISI DEL DNA PLASTIDIALE

La filogeografia contribuisce a mettere in evidenza le relazioni esistenti tra la struttura della diversità genetica e i processi migratori avvenuti nel post-glaciale e di conseguenza a comprendere la distribuzione attuale delle popolazioni in base a processi storici. Il marcatore più usato nella filogeografia vegetale è il DNA plastidiale.

Preliminarmente è stato effettuato un primo studio di filogeografia plastidiale utilizzando 15 regioni plastidiali amplificate usando dei primer universali:

Coppia di primers	Genes	Primers sequences 5'-3'	Lunghezza frammento
ANU_cp013L-14R	psbK - Trns(GCU)	tgttggcaagctgctgtaa gggttcgaatccctctcttt	600bp
ANU_cp018L-20R	trnG(UCC)ex1 – atpA	agccttccaagctaacgatg cctttgaaggaagctattcagg	490bp
ANU_cp021L-22R	atpA - atpFex2	ccttctgcaaattcgactaa caaggagctctaggaactctga	357bp
ANU_cp029L-30R	atpI - rps2	ttgaaacctcctatttgc atttggaggccgttct	400bp
ANU_cp064L-66R	trnV(UAC)ex2 - trnV(UAC)ex1	agggtatcacggactcgaac tcagtaggtagagcacctcgt	650bp
ANU_cp073L-74R	psaI - Ycf4	tgcaatggcttctttattct tctatccatatgttctgatcg	500bp
ANU_cp081L-82R	petE/G - trnP(UGG)	gggatcagttggatctttg caggttcaaactcgtcatcc	400bp
ANU_cp093L-94R	clpPex1 – psbB	aggtacttttggaaaccaat cgacagtatgaacacgatacc	600bp
accD_1F-4R	accD	agtatgggatccgtagtagg tcttttaccgcaaatgcaat	400bp
accD_2F-4R	accD	ggrgcacgatgcaagaagg tcttttaccgcaaatgcaat	400bp
ndhj_1F-4R	Ndhj	catagatctttgggcttyga tcaatgagcatcttgatttc	500bp
rpoB_1F-3R	rpoB	aagtgcattgttggactgg ccgtatgtggaaaagaagtata	500bp
rpoB_2F-3R	rpoB	atgcaactgcaagcagttcc ccgtatgtggaaaagaagtata	500bp
rpoC 1_1F-4R	rpoC 1	gtggatacacttcttgataatgg ccataagcatatcttgagttgg	400bp
rpoC 1_2F-4R	rpoC 1	ggcaaagagggaagatttgc ccataagcatatcttgagttgg	400bp

Per ogni regione, in quest'analisi preliminare, è stato sequenziato un individuo proveniente dalla Grecia, uno proveniente dalla Turchia, uno dalla Bulgaria ed infine un individuo per ogni popolazione italiana, quindi uno campano, uno calabrese ed uno siciliano, per un totale di 90

regioni sequenziate. Dall'analisi delle sequenze effettuate sui suddetti loci plastidiali è stato possibile, in base alle differenze riscontrate, costruire questo network:

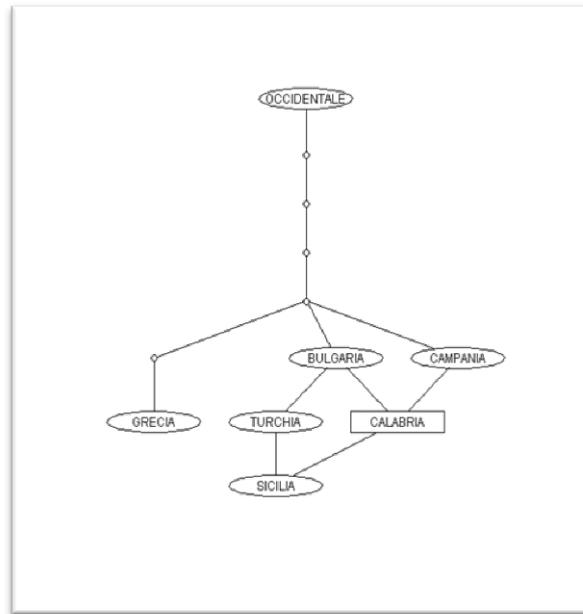


Figura 37 Network dell'allineamento delle sequenze plastidiali.

Con le sequenze ottenute è stato realizzato un network plastidiale col software TCS1.21, utilizzando come outgroup il *Platanus occidentalis* (Fig. 37).

Quest'ultimo risulta distante quattro mutazioni dal gruppo di *Platanus orientalis*. Le accessioni di *Platanus orientalis*, seppur evidenziano qualche piccola differenza, comunque, restano collocate tutte molto vicine, ad indicare una loro elevata similarità. Sulla base di tale risultato si è deciso di procedere con il sequenziamento dell'intero DNA plastidiale totale mediante tecniche di NGS.

Il sequenziamento NGS ha generato 588722 reads per la Grecia, 97494 reads per la Sicilia, 78598 reads per il Cilento e 992212 reads per la Bulgaria.

I files fastq ottenuti dal sequenziatore MiSeq sono stati ripuliti dagli adattatori con il programma Trimmomatic. <http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic> e successivamente è stato effettuato il controllo di qualità per ciascun file fastq. Il controllo di

qualità delle reads è stato effettuato con il programma fastqc del Babraham Institute (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)

Dal controllo di qualità effettuato con fastqc è stata riscontrata una perdita di qualità per tutte le reads di ciascun file fastq oltre i 200 nucleotidi (Fig. 38). Per migliorare la qualità dei files fastq, le reads sono state tagliate in corrispondenza del duecentesimo nucleotide (Fig. 39).

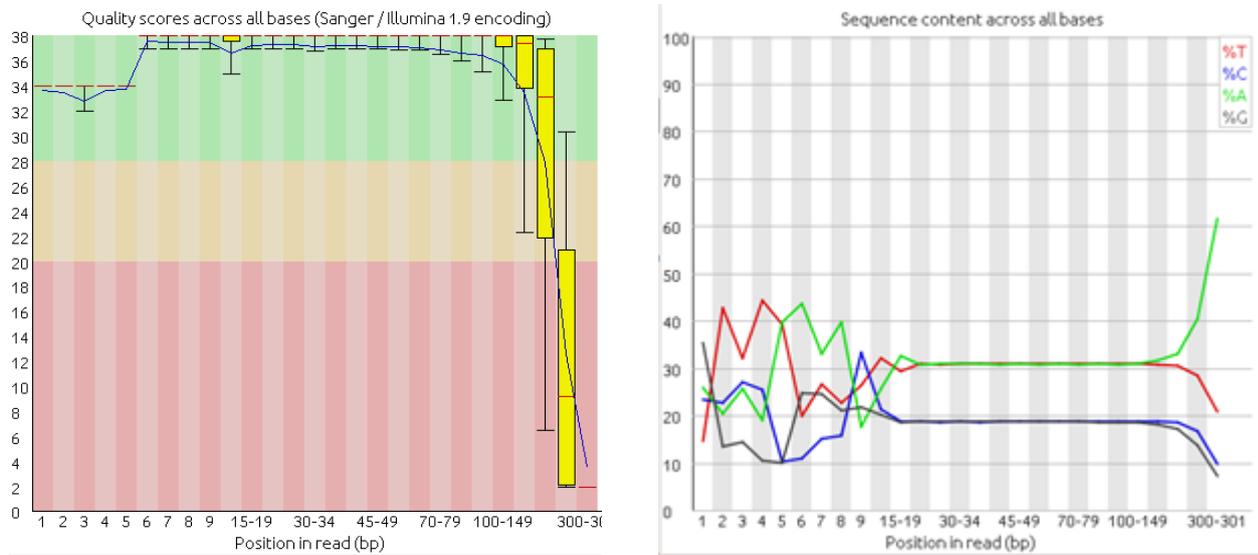


Figura 38 Generazione di sequenze con un alto contenuto di adenina oltre il duecentesimo nucleotide .

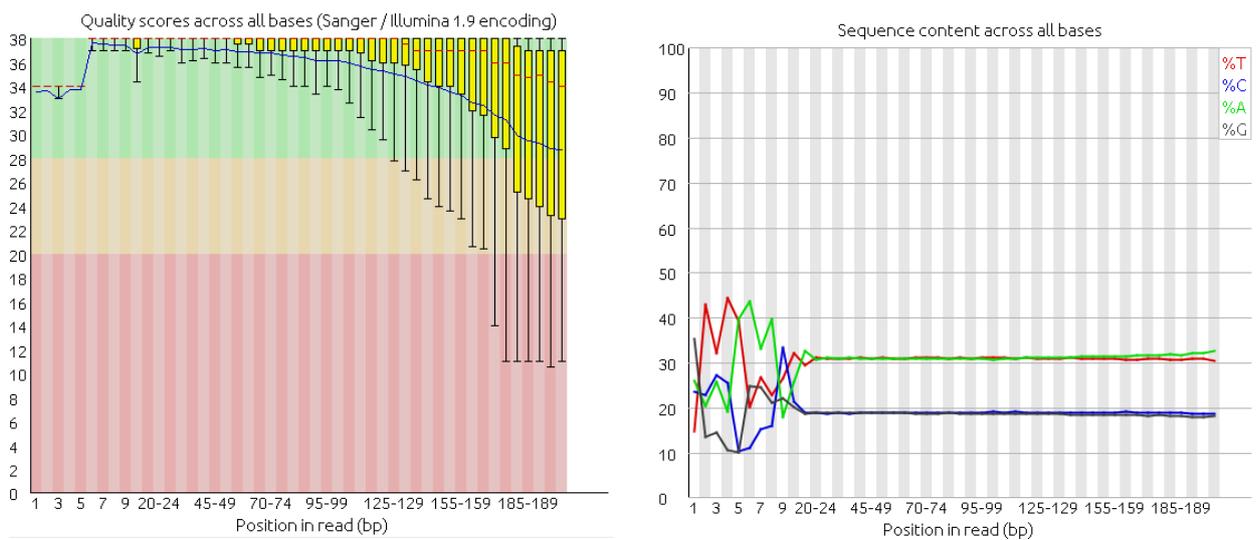


Figura 39 Aumento della qualità delle reads tagliandole in corrispondenza del duecentesimo nucleotide .

Una volta ripuliti dagli adattatori è aumentata la qualità e quindi è stato possibile mappare i file fastq contro un genoma plastidiale di riferimento. Il genoma plastidiale di riferimento usato per questa analisi è quello di *Platanus occidentalis*, disponibile presso la banca dati del National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Le reads di ciascun campione sono state allineate ed assemblate contro il genoma di riferimento del *Platanus occidentalis* usando il programma Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Questo programma richiede in input una sequenza conosciuta di genoma di riferimento e un insieme di reads provenienti dal sequenziamento del genoma di un individuo (files fastq). Il file di output generato dal programma BWA è in formato SAM (Sequence Alignment/Map) e riporta il posizionamento delle reads rispetto al genoma di riferimento. Il formato SAM è composto da una sezione di intestazione (header) e una sezione di allineamento. Le linee dell'header sono contrassegnate dal carattere '@'. Il file in formato SAM è stato convertito in BAM (Binary Alignment/Map). Il file BAM è la versione binaria del file SAM. I file SAM e i file BAM contengono le stesse informazioni, ma in un formato diverso. Il file SAM di ciascun campione è stato convertito in formato BAM utilizzando il programma SAMtools. SAMtools è un set di programmi che permettono di manipolare allineamenti e dati di Next Generation Sequencing. Il comando View consente di convertire un file dal formato SAM al BAM. Il comando sort ordina un file BAM in base alla sua posizione nel riferimento. Il comando index crea un nuovo file indice che permette al programma di consultare velocemente dei dati in un file SAM o BAM. Il comando Tview avvia un visualizzatore ASCII che può essere utilizzato per visualizzare come le reads sono allineate a piccole regioni del genoma di riferimento. Il comando mpileup produce un file in formato pile-up (o BCF) dando, per ogni coordinata genomica, la sovrapposizione delle reads ed evidenziando polimorfismi e indels in quella posizione nei file di input BAM. Il comando flagstat

consente di fare un'analisi statistica di quante reads mappano contro il genoma di riferimento rispetto a quelle totali.

	# total reads	Aligned reads	% aligned	Avg CVG (depth)
<u>Grecia 1</u>	588722	47412	8,05	58 x
<u>Sicilia 2</u>	97'494	15515	15,9	18,8 x
<u>Cilento 3</u>	78'598	13136	16,7	15,9 x
<u>Bulgaria 4</u>	992'212	21000	2,12	25,4 x

In tabella si osserva il numero di reads totali per ogni campione e quante reads sono state allineate contro il genoma di riferimento di *Platanus occidentalis*. Questi dati sono stati calcolati con il programma SAMtools flagstat (Fig. 40 e Fig. 41).



Figura 40 Allineamento delle reads contro il genoma di riferimento di *Platanus occidentalis* con il programma SAMtools tview.



Figura 41 Inserzioni del DNA plastidiale di *Platanus orientalis* rispetto al *Platanus occidentalis*.

Ottenuti i file BAM, è stata utilizzata la piattaforma GATK “Genome Analysis Toolkit” del Broad Institute <https://www.broadinstitute.org/gatk/>, per fare uno studio di variant calling. GATK è un pacchetto di programmi basato sul linguaggio JAVA che consente di analizzare e manipolare dati di Next Generation Sequencing. Una volta che i dati sono stati mappati al genoma di riferimento, e trasformati in formato BAM, sono state contrassegnate le reads duplicate con il comando MarkDuplicate. Questo è fondamentale perché durante il processo di sequenziamento, gli stessi frammenti di DNA possono essere sequenziati più volte. Le reads duplicate non sono informative e perciò non devono essere considerate. Il processo di “Mark Duplicate” (a volte chiamato “deduping” in gergo bioinformatico) non rimuove le reads, ma le identifica come duplicati aggiungendo un flag in corrispondenza della read nel file BAM.

Il processo di riallineamento, ottenuto con il comando RealignerTargetCreator identifica il posizionamento più consistente della indel nella reads. Esso si verifica in due fasi: in primo luogo, il programma identifica intervalli che devono essere riallineati, mentre nella seconda fase determina la sequenza consenso ottimale ed esegue il riallineamento effettivo della read. Il

comando HaplotypeCaller è stato utilizzato per effettuare un'analisi di variant calling. Questo programma rispetto agli altri è in grado di identificare SNPs e indels contemporaneamente tramite un assemblaggio locale de novo di aplotipi. L'output di questo comando è in formato .vcf (variant calling format) (Fig. 42). Il formato vcf è usato per memorizzare polimorfismi e indels all'interno di una sequenza genomica. Questo formato (.vcf) è stato sviluppato con l'avvento dei progetti di genotipizzazione e sequenziamento del DNA di grandi dimensioni, come ad esempio 1000 Genomes Project. Infine è stata costruita una sequenza consenso per ogni campione con il comando FastaAlternateReferenceMaker, esso consente di generare una sequenza consenso richiedendo in input, il genoma di riferimento opportunamente indicizzato, e il file in formato vcf.



Figura 42 Polimorfismi delle quattro popolazioni di *Platanus orientalis* rispetto al *Platanus occidentalis* con il programma IGV (Integrative Genomics Viewer).

Le consensus costruite, provenienti dai quattro campioni differenti, sono state poi allineate tra loro con il programma ClustalW. ClustalW è uno dei programmi più diffusi di allineamento multiplo che utilizza una strategia di tipo “progressivo” che consiste nel costruire progressivamente un allineamento multiplo di N sequenze a partire dagli allineamenti a coppie

tra le sequenze, i quali vengono ricombinati tra loro seguendo le indicazioni di un albero filogenetico. Il file di output di ClustalW in formato .aln è stato poi convertito prima in formato .meg dal programma Mega 7 <http://megasoftware.net/>. Con il programma Mega è stato poi possibile costruire un albero filogenetico con il metodo della massima parsimonia (Fig. 43). Il metodo di “minima evoluzione” o della “massima parsimonia” consente di costruire un albero filogenetico che ipotizza il percorso evolutivo più breve tra le sequenze che stiamo analizzando. Il sistema costruisce un albero a partire da una matrice delle distanze unendo un passo dopo l'altro le sequenze che sono più vicine.

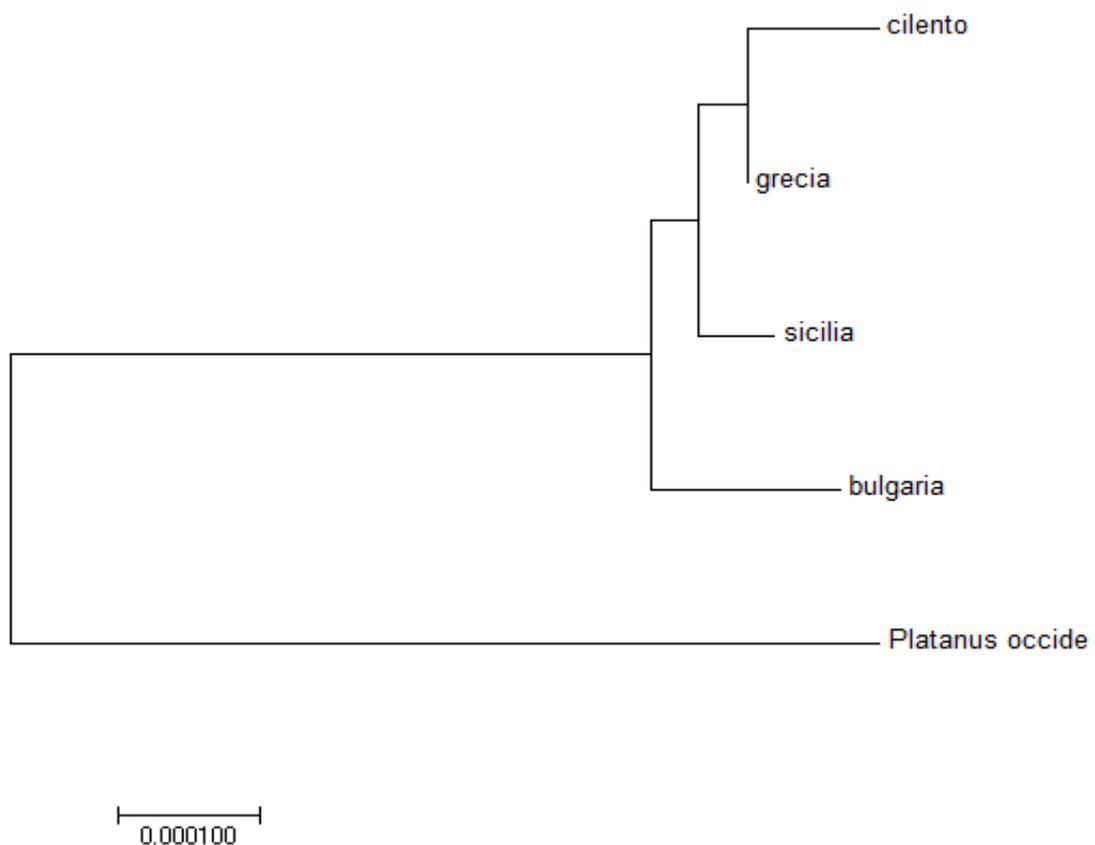


Figura 43 Albero plastidiale derivante dall'allineamento del DNA plastidiale totale.

I risultati di questa analisi sono in accordo con i dati preliminari ma permettono, data la maggior quantità di caratteri utilizzati derivanti dall'intero genoma plastidiale, di definire

meglio i rapporti tra le varie aree geografiche. L'albero ottenuto evidenzia, in accordo con il dendrogramma delle popolazioni basato sulla distanza genetica di Cavalli Sforza, e con le attribuzioni effettuate con Structure, che le popolazioni dell'Alento, non comprendenti la sottopopolazione omozigote, sono affini a quelle della Grecia continentale, mentre le popolazioni siciliane sono più vicine a quelle del Mediterraneo orientale. E' chiaro comunque che sarebbe necessario sequenziare DNA plastidiali provenienti da più accessioni per avere un quadro completo della situazione.

CONCLUSIONI

Una serie di conclusioni possono essere desunte dal presente studio:

- Le popolazioni periferiche dell'areale occidentale (in particolare l'Italia meridionale) sono caratterizzate da notevole isolamento e forte deriva genetica. La scarsa connettività, le ridotte dimensioni e il flusso pollinico, comunque limitato ad individui limitrofi, contribuiscono all'isolamento genico ed elevato inbreeding. Al contrario, le popolazioni al centro dell'areale sono più connesse e conservano, come atteso, una maggiore diversità genetica.
- Anche se molto sporadico, è presente del flusso genico con il platano coltivato, come testimoniato dal ritrovamento di alcuni alleli di *Platanus occidentale*/ibrido, in particolare negli individui e nella progenie dell'Alento. In condizioni di elevato isolamento, con poche possibilità di ricevere polline da popolazioni limitrofe, questo può rappresentare un rischio di erosione genetica delle popolazioni autoctone.
- La diversità genetica, sia come sequenze microsatellitari che come genoma plastidiale, sembra chiaramente indicare che le popolazioni siciliane non siano frutto di introduzione antropica (antichi Greci) come spesso suggerito in letteratura. Infatti, dal punto di vista dei loci microsatellitari pur avendo una minore ricchezza allelica e polimorfismi più bassi rispetto alle popolazioni centrali dell' areale sono comunque caratterizzate da sufficiente diversità genetica da escludere un evento di introduzione antropica. Inoltre, l'attribuzione Bayesiana con Structure raggruppa le popolazioni siciliane con le popolazioni greche insulari (Creta) e del Mediterraneo orientale (Bulgaria e Turchia) piuttosto che con le popolazioni della Grecia continentale da cui presumibilmente sarebbero state introdotte. Allo stesso modo, anche l'analisi di sequenziamento del DNA plastidiale, conferma una maggiore affinità delle popolazioni

siciliane con le popolazioni più orientali piuttosto che con quelle della Grecia continentale.

- Le popolazioni dell'Italia peninsulare (Cilento e Calabria), caratterizzate da ridotta variabilità genetica, vengono attribuite da Structure in un gruppo assieme alle popolazioni della Grecia continentale/Albania. Ovviamente in tal caso possono essere invocati sia la prossimità geografica che giustificherebbe la continuità genetica ai due lati dell'Adriatico ma anche un possibile evento di introduzione (nel caso effettuato comunque con un numero consistente di individui). L'analisi del DNA plastidiale conferma una maggiore similitudine con la Grecia continentale ma la non completa identità di sequenza sembra far propendere per un'origine autoctona delle popolazioni peninsulari piuttosto che un evento di introduzione. Un possibile effetto antropico è però evidente almeno per una parte della popolazione dell'Alento, che mostra una chiara demarcazione rispetto ai popolamenti contigui ed una struttura genica plausibile con uno scenario di moltiplicazione agamica mediata dall'uomo.
- Le popolazioni greche insulari (Creta) e del Mediterraneo orientale (Bulgaria e Turchia) rappresentano un gruppo distinto da quelle della Grecia continentale (Balcani) e sono forse state in connessione con quelle dell'Italia meridionale. Ciò può essere spiegato in termini di antica distribuzione nell'areale Mediterraneo e come conseguenza delle rotte migratorie postglaciali. È presumibile che ci sia stata una linea filetica distribuita in modo continuo dal Mediterraneo orientale a quello centrale (Creta e Sicilia incluse) ed una linea balcanica/continentale a cui invece appartengono le attuali popolazioni greco-albanesi. Sarebbe interessante verificare tale ipotesi allargando il campionamento alle popolazioni asiatiche.

- Il platano ha certamente una distribuzione relitta ma conserva abbastanza diversità genetica, nonostante una non elevata connessione genetica tra le popolazioni, come ci si aspetterebbe dalle modalità di dispersione anemogama del polline, e la principale minaccia, sembra essere legata alla riduzione degli habitat idonei. Ciò è particolarmente evidente in Italia meridionale che corrisponde anche alla porzione più periferica della distribuzione, e quindi, queste popolazioni risentono maggiormente dell'effetto bottleneck e deriva genica tipiche delle porzioni periferiche di areali non continui e di specie con ridotte capacità di dispersione.

BIBLIOGRAFIA

- Aldasoro, J. J., C. Aedo, C. Navarro, and F. Muñoz Garmendia, 1998 - The genus *Sorbus* L. (Rosaceae) in Europe and the N of Africa. *Systematic Botany* 23: 189–212.
- Accordi S. M., 1986 – Spread of *ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* through root anastomoses. *Inform. Fitopat.*, 36: 53-58.
- Argant J., 2004 - The late pliocene site of Saint-Vallier (Drome, France): pollen analysis. *Geobios* 37: 81–90.
- Aronson, J., Bodiou, J. Y., & Boeuf, G., 2010 - The Mediterranean region: biological diversity through time and space. Oxford: Oxford University Press.
- Asouti E., Hather J., 2001 - Charcoal analysis and the reconstruction of ancient woodland vegetation in the Konya Basin, southcentral Anatolia, Turkey: Results from the Neolithic site of Çatalhöyük East. *Veg Hist Archaeobot* 10: 23–32.
- Axelrod D. I., 1988 - Outline history of California vegetation. Pp. 139-193 in *Terrestrial vegetation of California*, eds. M. C. Barbour and J. Major. Sacramento: California Native Plant Society.
- Axelrod D. I., 1975 - Evolution and biogeography of Madrean-Tethyan sclerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62:280–334.
- Barbagallo C., Brullo S., Fagotto F., 1979 – Vegetazione a “*platanus orientalis* L.” e altri aspetti igrofilii dei fiumi iblei (Sicilia meridionale). pubbl. Ist. Bot. univ. catania, catania. 28 pp.
- Barrier E., L. Velasquillo, M. Chavez, and R. Gaulon, 1998 - Neotectonic evolution of the Isthmus of Tehuantepec (south eastern Mexico). *Tectonophysics* 287: 77-96.
- Barton N. H. and G. M. Hewitt, 1989 - Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341: 497–503.
- Beaudouin C., Suc J. P., Acherki N., Courtois L., Rabineau M., Aloisi J.C. et al., 2005 - Palynology of the northwestern Mediterranean shelf (Gulf of Lions): First vegetational record for the last climatic cycle. *Mar Petrol Geol* 22: 845–863.
- Beguinot A., 1925 – Osservazioni sull’indigenato del *Platanus orientalis* L. nell’Italia del sud e nella Sicilia orientale. *Boll. R. Istituto Botanico Modena*. tip. valbonesi, Forlì.
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F., 1999 - GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bennet K. D., Tzedakis P. C., Willeks K. J., 1991 - Quaternary refugia of North European trees. *Journal of Biogeography*, 18: 103-115.
- G. Benson, - Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.

- Berger A., 1988 - Milankovitch Theory and climate. *Reviews of Geophysics*, 26(4): 624–657.
- Bertini A., 2001 - Pliocene climatic cycles and altitudinal forest development from 2.7Ma in the Northern Apennines (Italy): Evidence from the pollen record of the Stirone section (25.1 to 22.2 Ma). *Geobios* 34(3): 253–265.
- Bertini A., Martinetto E., 2008 - Messinian to Zanclean vegetation and climate of Northern and Central Italy. *Boll Soc Paleontol I* 47(2): 105–121.
- Bertini A., 2006 - The Northern Apennines palynological record as a contribute for the reconstruction of the Messinian palaeoenvironments. *Sediment Geol* (188-189): 235–258.
- Bertini A., Magi M., Mazza P. P. A., Fauquette S., 2010 - Impact of short-term climatic events on latest Pliocene land settings and communities in Central Italy (Upper Valdarno basin). *Quatern Int* 225: 92–105.
- Bertoldi R., Rio D., Thunell R., 1989 - Pliocene-Pleistocene vegetational and climatic evolution of the south-central Mediterranean. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 72: 263 – 275.
- Besnard G., R. Rubio de Casas and P. Vargas, 2007 - Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography* 34: 736–752.
- Bianchi C. N. e Morri C., 2000 - Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Mar. Poll. Bull.*, 40 (5): 367-376.
- Biju – Duval B., J. Dercourt and X. Le Pichon, 1976 - La genèse de la Méditerranée. *La Recherche* 7: 811–822.
- Biondi E., Blasi C., Burrascano S., Casavecchia S., Copiz R., Del Vico E. et al., 2009 - Available: DPN <http://vnr.unipg.it/habitat/>. Accessed July 2014 Manuale Italiano di Interpretazione degli Habitat della Direttiva 92/43/CEE. Societa` Botanica Italiana – MATTM.
- Biondi E., Blasi C., 2015 - Prodomo della Vegetazione d'Italia. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, <http://www.prodomo-vegetazione-italia.org/>.
- Biondi E., Blasi C., Burrascano S., Casavecchia S., Copiz R., Del Vico E., Galdenzi D., Gigante D., Lasen C., Spampinato G., Venanzoni R., Zivkovic L., 2009 - Manuale Italiano di interpretazione degli habitat della Direttiva 92/43/CEE. <http://vnr.unipg.it/habitat>.
- Blondel J. & Aronson J., 1999 - *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford University Press.
- Blondel J., Aronson, J., Bodiou, J. Y., & Boeuf, G., 2010 - *The Mediterranean region: biological diversity through time and space*. Oxford: Oxford University Press.
- Boothroyd L. E., 1930 – The morphology and anatomy of the inflorescence and flower of the Platanaceae. *American Journal of Botany*, Vol. 17: 678 – 693.

- Bottema S., Sarpaky A., 2003 - Environmental change in Crete: A 9000-year record of Holocene vegetation history and the effect of the Santorini eruption. *Holocene* 13: 733–749.
- Boudouresque C. F., 2004 - Marine biodiversity in the Mediterranean: status of species, populations and communities. *Sci. Rep. Port-Cros natl Park, Fr.*, 20: 97-146.
- Brullo S., Spampinato G., 1990 – La vegetazione dei corsi d’acqua della Sicilia. *Boll. acc. Gioenia Sci. nat.*, 23(336): 119-252.
- Butler J. M., Buel E., Crivellante F., Mc Cord B., 2004 - Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25: 1397-1412.
- Calo` C., Henne P. D., Curry B., Magny M., Vescovi E., La Mantia T. et al., 2012 - Spatio-temporal patterns of Holocene environmental change in southern Sicily. *Palaeogeogr Palaeoclimatol* 323-325: 110–122.
- Carpenter, R. J., Hill, R. S., & Jordan, G. J., 2005 - Leaf cuticular morphology links Platanaceae and Proteaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 166(5), 843-855.
- Caruso G., Gangale C., Uzunov D., & Pignotti L., 2008 - Chorology of *Platanus orientalis* (Platanaceae) in Calabria (S Italy). *Phytol Balcan*, 14(1), 51-56.
- Caruso G., Croce A., Gianguzzi L., Ilardi V., Santangelo A., Uzunov D., 2012 – *Platanus orientalis* L. *Informatore Botanico Italiano*, 44 (2) 405 – 474.
- Celesti-Grapow L., Alessandrini A., Arrigoni P. V., Banfi E., Bernardo L., Bovio M., et al., 2009 - Inventory of the non-native flora of Italy. *Plant Biosyst* 143: 386–430.
- Chen, Z. and J. Li, 2004 - Phylogenetics and biogeography of *Alnus* (Betulaceae) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region. *International Journal of Plant Sciences* 165: 325-335.
- Combourieu-Nebout N., 1993 - Vegetation response to upper Pliocene Glacial/Interglacial cyclicity in Central Mediterranean. *Quaternary Research*, 40: 228 – 236.
- Combourieu-Nebout N., 1995 - Réponse de la végétation de l’Italie méridionale au seuil climatique de la fin du Pliocène d’après l’analyse pollinique haute résolution de la section Semaforo (2,46 à 2,1 Ma), *CR Acad Sci. Paris* 321: 659–665.
- Comps B., Gomory D., Letouzey J., Thiebaut B., Petit R. J., 2001 - Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157: 389-97.
- Cook L. G., Crisp M. D., 2005 - Directional asymmetry of long-distance dispersal and colonization could mislead reconstructions of biogeography. *Journal of Biogeography* 32: 741–754.
- Corbetta F., Pirone G., Frattaroli A. R., Clascetti G., 2004 – Lineamenti della vegetazione del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. *Braun-Blanquetia*, 36: 1-61.

- Cox C. B., Moore P. D., 1985 - *Biogeography. An ecological and evolutionary approach*. Fourth Ed. Blackwell.
- Crane P. R., 1989 - Paleobotanical evidence on the early radiation of nonmagnoliid dicotyledons. *Plant Systematics and Evolution* 162: 165-191.
- Crane P. R., K. R. Pedersen, E. M. Friis, and A. N. Drinnan, 1993 - Early Cretaceous (Early to Middle Albian) platanoid inflorescences associated with Sapindopsis leaves from the Potomac Group.
- Cronquist A., 1981 - *An Integrated System Of Classification Of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Davis M. B., 1976 - Pleistocene biogeography of temperate deciduous forests. *Geoscience Canada*, 13: 13–26.
- Davis C. C., P. W. Fritsch, J. Li, and M. J. Donoghue, 2002 - Phylogeny and biogeography of *Cercis* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *ndhF* sequence data. *Systematic Botany* 27: 289-302.
- Daza Luis M., and Juan P. Donaire, 1982 - Lipid biosynthesis by chloroplast from olive tree leaves. *Physiol. Plant.* 54: 207-212. Copenhagen.
- de Queiroz A., 2005 - The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 68–73.
- Deevey E. S., 1949 - *Biogeography of the Pleistocene*. The Geological Society of America Bulletin 60: 1315-1416.
- Denk T. & Tekleva M. V., 2006 – Comparative pollen morphology and ultrastructure of *Platanus*: Implications for phylogeny and evaluation of the fossil record. *Grana*, 45:3 195 – 221.
- Development Core Team R., 2012 - R: A language and environment for statistical computing.
- Dick C. W., Abdul-Salim K., Bermingham E., 2003 - Molecular systematic analysis reveals cryptic tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. *American Naturalist* 162: 691–703.
- Djamali M., H. Kürschner, H. Akhani, J.- L. de Beaulieu, A. Amini, V. Andrieu - Ponel, P. Ponel, and L. Stevens, 2008 - Palaeoecological significance of the spores of the liverwort *Riella* (Riellaceae) in a late Pleistocene long pollen record from the hypersaline Lake Urmia, NW Iran. *Review of Palaeobotany and Palynology* 152: 66–73.
- Djamali M., J.-L. de Beaulieu, M. Shah - Hosseini, V. Andrieu - Ponel, P. Ponel, A. Amini, H. Akhani, A. S. Leroy, L. Stevens, H. Alizadeh and S. Brewer, 2008a - A late Pleistocene long pollen record from Lake Urmia, NW Iran. *Quaternary Research* 62: 413–420.

- Djordjević-Milutinović D., Dulić I., 2009 - Leaf polymorphism of *Platanus neptuni* m. f. *fraxinifolia* (Johnson & Gilmore) Kvaček & Manchester from Oligocene deposits at Janda (Mt. Fruska Gora, Serbia). *Bull Nat Hist (Belgrade)* 2: 7–33.
- Do N., and R. P. Adams, 1991 - A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques* 10.2: 162-164.
- Donoghue M. J., Bell C. D., Li J., 2001 - Phylogenetic patterns in Northern Hemisphere plant geography. *International Journal of Plant Science* 162: S41–S52.
- Donoghue M. J., Smith S. A., 2004 - Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B — Biological Sciences* 359: 1633–1644.
- Dow B. D. and M. V. Ashley, 1998 - High Levels of Gene Flow in Bur Oak Revealed by Paternity Analysis Using Microsatellites.
- Doyle J. J. & Doyle J. L., 1987 - A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America*, 19: 11-15.
- Dressler R. L., 1954 - Some floristic relationships between Mexico and the United States. *Rhodora* 56: 81-96.
- Dring J., Hoda P., Mersinillari M., Mullaj A., Pignatti S. & Rodwell J., 2002 - Plant communities of Albania a preliminary overview. *Annali di Botanica (Roma)* 2: 7–30.
- Earl, Dent A. and von Holdt, Bridgett M., 2012 - STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ebert Daniel, and Rod Peakall, 2009 - A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of noncoding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. *Molecular Ecology Resources* 9.3: 777-783.
- El Mousadik A. and Petit R. J., 1996 - High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832-839.
- Emig C. C. & Geistdoerfer P., 2004 - The Mediterranean deepsea fauna: historical evolution, bathymetric variations and geographical changes. *Carnet de Geology / Notebook on Geology, Manteinon*, 2004/1, 10 pp.
- Ennos R. A., 1994 – Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.
- European Commission, 2013 - The Interpretation Manual of European Union Habitats - EUR28. Bruxelles, European Commission DG Environment, 144 pp.

- 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 (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*; 1:47–50.
- Fauquette S., Guiot J., Suc J.-P., 1998a - A method for climatic reconstruction of the Mediterranean Pliocene using pollen data. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 144: 183–201.
- Fauquette S., Quézel P., Guiot J., Suc J.-P., 1998b - Signification bioclimatique de taxons-guides du Pliocène Méditerranéen. *Geobios* 31: 151–169.
- Feng Y., Oh S.-H., Manos P. S., 2005 - Phylogeny and historical biogeography of the genus *Platanus* as inferred from nuclear and chloroplast DNA. *Systematic Botany* 30: 786–799.
- Florenzano A., Mercuri A. M., 2012 - Palynology of archaeological sites: the example of economy and human impact of the Metaponto area (6th-1st century BC). *Rend Online Soc Geol Ital* 21: 750–752.
- Fortelius M., Eronem J., Liu L., Pushkina D., Tesakov A., Vislobokova I., Zhang Z., 2006 - Late Miocene and Pliocene large land mammals and climatic changes in Eurasia. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 238: 219 – 227.
- Frankel O. H., Brown A. H. D., Burdon J. J., 1995 - *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press.
- Friis, E. M. and P. R. Crane, 1989 - Reproductive structures of Cretaceous Hamamelidae. Pp. 155-174 in *Evolution, systematics and fossil history of the Hamamelidae*, Vol. 1, eds. P. R. Crane and S. Blackmore. Oxford: Clarendon Press.
- Fritsch P., 1999 - Phylogeny of *Styrax* based on morphological characters, with implications for biogeography and infrageneric classification. *Systematic Botany* 24: 356–378.
- Fritsch P., 1996 - Isozyme analysis of intercontinental disjuncts within *Styrax* (Styracaceae): implications for the Madrean Tethyan hypothesis. *American Journal of Botany* 83: 342-355.
- Fritsch P., 2001 - Phylogeny and biogeography of the flowering plant genus *Styrax* (Styracaceae) based on chloroplast DNA restriction sites and DNA sequences of the internal transcribed spacer region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 387-408.
- Garcia C., Jordano P., Godoy J. A., 2007 - Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Molecular Ecology* 16 (9): 1947-1955.
- Gauthier A. 1992 - Paléoenvironnements du Pléistocène moyen dans le sud de la France. Apport et limites de l'analyse pollinique de trois sites préhistoriques: Caune de l'Arago, Orgnac 3, Grotte du Lazaret. Thèse de Doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle Paris: Institut de Paléontologie humaine.

- Gerber S., Chabrier P., Kremer A., 2003 - FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular Ecology Notes* 3 (3): 479-481.
- Ghetti P., Anadon P., Bertini A., Esu D., Gliozzi E., Rook L., Soulie-Marsche I., 2002 - The Early Messinian Velona basin (Siena, central Italy): Palaeoenvironmental and paleobiogeographical reconstructions. *Palaeogeogr. Palaeocl.* 187: 1–33.
- Gianguzzi L., Papini F., Cusimano D., 2016 - Phytosociological survey vegetation map of Sicily (Mediterranean region). Taylor & Francis. Retrieved: 13 16, Jan 12, 2016 (GMT). <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1574182>.
- Gianguzzi L., Raimondo F. M., Riggio S., 1995 – Relics of riverine *platanus orientalis* L. forest in the Oreto valley, Palermo. *Giorn. Bot. Ital.*, 129(2): 187.
- Gladenkov A. Y., Oleinik A. E., Marincovich L., Barinov K. B., 2002 - A refined age for the earliest opening of Bering Strait. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 183: 321–328.
- Glaubitz J. C., 2004 - CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages, *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.
- Goiran J. P., Salomon F., Mazzini I., Bravard J. P., Pleuger E., Vittori C. et al., 2014 - Geomorphology confirms location of the ancient harbour basin of Ostia (Italy). *J Archaeol Sci* 41: 389–398.
- Goudet J., 1995 - FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered.* 86:485–486.
- Goudet J., 2001 - FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). (www.unil.ch/izea/software/fstat.html).
- Graham A., 1973 - History of the arborescent temperate element in the northern Latin American biota. Pp. 301-314 in *Vegetation and vegetational history of northern Latin America*, ed. A. Graham. New York: Elsevier.
- Graham A., 1999a - Late Cretaceous and Cenozoic history of North American vegetation. New York: Oxford University Press.
- Graham A., 1999b - The Tertiary history of the northern temperate element in the northern Latin American biota. *American Journal of Botany* 86: 32-38.
- Grant Verne, 1963 - The origin of adaptations. Columbia University Press.
- Group, C. P. W., Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., ... & Fazekas A. J., 2009 - A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Grueva M., & Zhelev P. 2011 - Population genetic structure of *Platanus orientalis* L. in Bulgaria. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 4(4), 186.

- Gruger E., Thulin B., Muller J., Schneider J., Alef J., Welter-Schultes F.W., 2002 - Environmental changes in and around Lake Avernus in Greek and Roman times. In: Jashemski WF, Meyer FG, editors. *The Natural History of Pompeii*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 240–273.
- Gruger E., Thulin B., 1998 - First results of biostratigraphical investigations of Lago d'Averno near Naples relating to the period 800 BC^800 AD. *Quatern Int* 47/48: 35–40.
- Hays J. D., Imbrie J., Shackleton N. J., 1976 - Variations in the Earth's orbit: pacemaker of the ice ages. *Science*, 194: 1121-1132.
- Hewitt Godfrey M., 1996 - Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation." *Biological journal of the Linnean Society* 58.3: 247-276.
- Hileman L. C., M. C. Vasey, and V. T. Parker, 2001 - Phylogeny and biogeography of the *Arbutioideae* (Ericaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Systematic Botany* 26: 131-143.
- Hollingsworth, Peter M., et al., 2009 - A DNA barcode for land plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.31: 12794-12797.
- Hoot S. B., S. Magallin, and P. R. Crane, 1999 - Phylogeny of basal eudicots based on three molecular datasets: *atpB*, *rbcL*, and 18S nuclear ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 1-32.
- Hsü K. J., 1971 - Origin of the Alps and western Mediterranean. *Nature* 233:44–48.
- Hsu K., L. Montadert, D. Bernouilli, M. B. Cita, A. Erickson, R. E. Garrison, R. B. Kidd, F. Melieres, C. Müller, and R. Wright, 1977 - History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* 267:399–403.
- Hu X., Ennos S. R., 1999 – Impacts of seed and pollen flow on populations genetics structure for plant genomes with three contrasting mode of inheritance. *Genetics*, 152: 441-450.
- Isagi Y., Saito D., Kawaguchi H. et al., 2007 - Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *Journal of ecology* 95 (5): 983-990.
- Ivanov D., Ashraf A. R., Mosbrugger V., Palamarev E., 2002 - Palynological evidence for Miocene climate change in the Forecarpathian Basin (Central Parathetys, NW Bulgaria). *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 178: 19 -37.
- Jansen R. K., Raubeson L. A., Boore J. L., Chumley T. W., Haberle R. C., Wyman S. K., ... & Kuehl J. V., 2005 - Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods in enzymology*, 395, 348-384.
- Jashemski W. F., Meyer F. G., Ricciardi M., 2002 – Plants - evidence from wall paintings, mosaics, sculpture, plant remains graffiti, inscription and ancient authors. In: Jashemski WF, Meyer FG, editors. *The natural history of Pompeii*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 80–180.

- Jashemski W. F., 1979 - The gardens of Pompeii, Herculaneum and the villas destroyed by Vesuvius. vol 1. New Rochelle: Caratzas Brothers.
- Joannin S., Brugiapaglia E., de Beaulieu J. L., Bernado L., Magny M., Peyron O. et al., 2012 - Pollen-based reconstruction of Holocene vegetation and climate in southern Italy: The case of Lago di Trifoglietti. *Clim Past* 8: 1973–1996.
- Jombart T., 2008 - Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.*; 24:1403–1405. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129 PMID: 18397895.
- Juan C., B. C. Emerson, P. Oromi, and G. M. Hewitt, 2000 - Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends in Ecology & Evolution* 15: 104–109.
- Krijgsman W., E. J. Hilgen, I. Raffi, F. J. Sierro, and D. S. Wilson, 1999 - Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature* 400: 652–655. *Plant Systematics and Evolution* 244: 1-29.
- Kvacek, Z. & S.-X. Guo, 2001 - Trifoliolate leaves of *Platanus bella* (Heer) comb. n. from the Paleocene of North America, Greenland, and Asia and their relationships among extinct and extant Platanaceae. *International Journal of Plant Sciences* 162: 441-458.
- Kvacek, Z. and S. R. Manchester, 2004 - Vegetative and reproductive structure of the extinct *Platanus neptuni* from the Tertiary of Europe and relationships within the Platanaceae. *Plant Systematics and Evolution* 244: 1-29.
- Kvacek, Z., 2010 - Forest flora and vegetation of the European early Palaeogene – A review. *Bull Geosci* 85: 63–76.
- Lang K. R., 2010 - Microsatellite development in *Platanus* for documenting gene flow among species. Master of Science in Biological Sciences California State University.
- Lang E. G., Mueller S. J., Hoernstein S. N., Porankiewicz-Asplund J., Vervliet-Scheebaum M., & Reski R., 2011 - Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant cell reports*, 30(2), 205-215.
- Lavin M., Thulin M., Labat J. N., Pennington R. T., 2000 - Africa, the odd man out: molecular biogeography of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise. *Systematic Botany* 25: 449–467.
- Leberg P. L., 2002 - Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*, 11: 2445–2449.
- Li J., Donoghue M. J., 1999 - More molecular evidence for interspecific relationships in *Liquidambar* (Hamamelidaceae). *Rhodora* 101: 87–91.
- Liston A., 1997 - Biogeographic relationships between the Mediterranean and North American floras: insights from molecular data. *Lagascalia* 19: 323-330.

- MacGinitie H. D., 1969 - The Eocene Green River flora of northwestern Colorado and northeastern Utah. University of California Publications in Geological Sciences 83: 1-203.
- Magallon S., P. S. Herendeen, and P. R. Crane, 1997 - *Quadriplatanus georgianus* gen. et sp. nov.: staminate and pistillate platanaceous flowers from the Late Cretaceous (Coniacian-Santonian) of Georgia, U S.A. International Journal of Plant Sciences 158: 373-394.
- T. Magoc and S. Salzberg, 2011 - FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics 27:21 , 2957-63.
- Magyari E. K., J. C. Chapman, B. Gaydarska, E. Marinova, T. Deli, J. P. Huntley, J. R. M. Allen, and B. Huntley, 2008 - The 'oriental' component of the Balkan flora: evidence of presence on the Thracian Plain during the Weichselian late-glacial. Journal of Biogeography 35: 865–883.
- Manchester S. R., 1986 - Vegetative and reproductive morphology of an extant plane tree (Platanaceae) from the Eocene of western North America. Botanical Gazette 147: 200-226.
- Manchester S. R., 1994 - Fruits and seeds of the Middle Eocene Nut Beds Flora, Clarno.
- Manos P. S. and A. M. Stanford, 2001 - The historical biogeography of Fagaceae: tracking the Tertiary history of temperate and subtropical forests of the Northern Hemisphere. International Journal of Plant Sciences (Supplement) 162: S77-S93.
- Manos P. S., 1993 - *Quercus* section *Protobalanus*. Pp. 468-471 in Flora of North America, Vol. 3, ed. Flora of North America editorial committee, New York: Oxford University Press.
- Mansion G., G. Rosenbaum, N. Schoenenberger, G. Bacchetta, J. A. Rossello, and E. Conti, 2008 - Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family araceae. Systematic Biology 57:269–285.
- Marchi D. P., Pepe D'Amato E., Bianchi G., 2013 - Famiglie di piante vascolari italiane. Roma: Casa editrice "La Sapienza".
- Mariotti Lippi M., Mori Secci M., 1997 - Aeropalynology in the Roman city of Pompeii (Italy). Allionia 35: 241–247.
- Mariotti Lippi M., 2000 - The garden of the "Casa delle Nozze di Ercole ed Ebe" in Pompei (Italy): palynological investigations. Plant Biosyst 134: 205–211.
- Mariotti Lippi M., Bellini C., 2006 - Unusual palynological evidence from gardens and cropfields of ancient Pompeii (Italy). In: Morel J. P., Tresserras J., Matamala J. C., editors. Proceeding of the 1st conference on crop field and garden archaeology. The archaeology of crop fields and gardens 1–3 June 2006. Bari: Edipuglia. pp. 153–159.
- Mariotti Lippi M., Bellini C., Trinci C., Benvenuti M., Pallecchi P., Sagri M., 2007 - Pollen analysis of the ship site of Pisa San Rossore, Tuscany, Italy: The implications for catastrophic hydrological events and climatic change during the late Holocene. Veg Hist Archaeobot 16: 453–465.

- Martinetto E., Uhl D., Tarabra E., 2007 - Leaf physiognomic indications for a moist warm-temperate climate in NW Italy during the Messinian (Late Miocene). *Palaeogeogr Palaeoclimatol* 253: 41–55.
- Maslova N. P., 1997 - The genus *Platanus* L. (Platanaceae Dumortier) in the Paleocene of Kamchatka. *Paleontological Journal* 31: 208-214.
- Maslova N. P., 2003 - Extinct and extant Platanaceae and Hamamelidaceae: morphology, systematics, and phylogeny. *Paleontological Journal* 37: S467-S590.
- Matvejević P., 1999 - *Mediterranean: A Cultural Landscape*. University of California Press, Berkeley, CA.
- McCauley, David E., 1994 - Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.17: 8127-8131.
- McGlone M. S., 2005 - Goodbye Gondwana. *Journal of Biogeography* 32: 739–740.
- McGuire, A. F., and K. A., Kron. 2005 - Phylogenetic relationships of European and African *Ericas*. *International Journal of Plant Science* 166: 311–318.
- McKenna M. C., 1983 - Cenozoic paleogeography of North Atlantic land bridges. In Bott MHP, Saxov S, Talwani M, Thiede J, eds. *Structure and development of the Greenland–Scotland bridge: new concepts and methods*. New York, NY: Plenum, 351–395.
- Médail F. & Quézel P., 1999 - Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: Setting global conservation priorities. *Conservation Biology*, 13: 1510-1513.
- Médail F., Quézel P., 1997 - Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84: 112-117.
- Mercuri A. M., Accorsi C. A., Bandini Mazzanti M., 2002 - The long history of *Cannabis* and its cultivation by the Romans in central Italy, shown by pollen records from Lago Albano and Lago di Nemi. *Veg Hist Archaeobot* 11: 263–276.
- Mercuri A. M., in press. Applied Palynology as a trans-disciplinary science: The contribution of aerobiology data to forensic and palaeoenvironmental issues. *Aerobiologia*.
- Mercuri A. M., Florenzano A., Massamba N'siala I., Olmi L., Roubis D., Sogliani F., 2010 - Pollen from archaeological layers and cultural landscape reconstruction: case studies from the Bradano valley (Basilicata, southern Italy). *Plant Biosyst* 144: 888–901.
- Mercuri A. M., Bandini Mazzanti M., Florenzano A., Montecchi M. C., Rattighieri E., 2013 - *Olea*, *Juglans* and *Castanea*: The OJC group as pollen evidence of the development of human-induced environments in the Italian peninsula. *Quatern Int* 303: 24–42.

- Michaud H., Lumaret R. J., Ripoll P., Toumi L., 1995 - A procedure for the extraction of chloroplast DNA from broad-leaved tree species. *Plant Molecular Biology Reporter* 13 (2): 131-137.
- Milankovitch M., 1941 - Canon of Insolation and the Ice-Age Problem. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem (1969).
- Milne R. I., Abbott R. J., 2002 - The origin and evolution of Tertiary relict floras. *Advances in Botanical Research* 38: 281–314.
- Milne R. I., 2004 - Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a Tertiary relict distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 389–401.
- Milne R. I., 2006 – Northern Hemisphere plant disjunctions: A window on Tertiary land bridges and climate change?. *Annals of Botany* 98: 465-472.
- Moggi G., 2001 – Segnalazioni floristiche italiane: 1038-1040. *Inform. Bot. Ital.*, 33(2): 421-424.
- Moore M. J., Shaw R., Farmerie W. G., Soltis P. S. and Soltis D. E., 2005 - Plastid genome sequencing using the 454 genome sequencer system: a chloroplast isolation/whole- genome amplification approach. Unpublished.
- Moser D., Allevato E., Clarke J. R., Di Pasquale G., Nelle O., 2013 - Archaeobotany at Oplontis: woody remains from the Roman Villa of Poppaea (Naples, Italy). *Veg Hist Archaeobot* 22: 397–408.
- Myers N., Mittermeier R. A., Mittermeier C. G., da Fonseca G. A. B., Kent J., 2000 - Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Myers N., 1988 - Threatened biotas: “Hot spots” in tropical forests. *The Environmentalist* 8: 1–20.
- Myers N., 1990 - The biodiversity challenge: Expanded hot spots analysis. *The Environmentalist* 10: 243–256.
- Nahal I., Rahme A., 1990 - Le Platane d'Orient (*Platanus orientalis* L.) dans la région du Proche Orient. *Forêt Méditerranéenne*, t. XII, n° 2: 11-124.
- Nei M., 1987 – Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York NY, USA.
- Nixon K. C. and C. H. Muller, 1997 - *Quercus* section *Quercus*. Pp. 471-506 in *Flora of North America*, Vol. 3, ed. *Flora of North America* editorial committee. New York: Oxford University Press.
- Nixon K. C. and J. M. Poole, 2003 - Revision of the Mexican and Guatemalan species of *Platanus* (*Platanaceae*). *Lundellia* 6: 103-137.
- Noti R., van Leeuwen J. F. N., Colombaroli D., Vescovi E., Pasta S., La Mantia T. et al., 2009, - Mid- and late-Holocene vegetation and fire history at Biviere di Gela, a coastal lake in southern Sicily, Italy. *Veg Hist Archaeobot* 18: 371–387.

- Oddou-Muratorio S. et al., 2001 - Pollen-versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species." *Evolution* 55.6: 1123-1135.
- Ohsawa T., Tsuda Y., Saito Y. et al., 2007 - Steep slopes promote downhill dispersal of *Quercus crispula* seeds and weaken the fine-scale genetic structure of seedling populations. *Annals of forest science* 64 (4): 405-412.
- Öztürk M., Çelik A., Güvensen A., Hamzaoğlu E., 2008 - Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill.. *Forest Ecology and Management*, 256 (2008), pp. 510–518.
- Palamarev E., 1989 - Paleobotanical evidence of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics and Evolution* 162:93–107.
- Panagiotas K., Tiniakou A., Georgiadis T., 2008 - A distribution model of habitat types along the rivers of W. Greece: a case study. *Fresenius Environmental Bulletin*. 17 (6): 713-721.
- Panconesi A., 1999 – Canker stain of plane tree: a serious danger to urban plantings in Europe. *J. plant pathol.*, 81: 3-15.
- Papazachos B. C. and C. Papazachou, 2003 - The Earthquakes of Greece. Ziti Publ., Thessaloniki.
- Parlatore F., 1867 – *Flora Italiana*. vol. 4: 373. tipografia dei successori Le Monnier, Firenze.
- Pasta S., Cullotta S., La Mantia T., 2000 - Ecogeografia e ruolo fisionomico-strutturale delle Querce sempreverdi in Sicilia. In: Bucci G., Minotta G., Borghetti M (eds.) *Atti II Congresso SISEF: Applicazioni e prospettive per la ricerca Forestale Italiana*: 66.
- Peakall R. O. D. and Smouse P. E., 2006 - Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pennington R. T., Cronk Q. C. B., Richardson J. A., 2004 - Introduction and synthesis: plant phylogeny and the origin of major biomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B—Biological Sciences* 359: 1455–1464.
- Pepe C., Giardini M., Giraudi C., Masi A., Mazzini I., Sadori L., 2013 - Plant landscape and environmental changes recorded in marginal marine environments: The ancient Roman harbour of Portus (Rome, Italy). *Quatern Int* 303: 73–81.
- Petit R. J., 1992 - Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces: les chênes blancs européens." *Approche de génétique des populations*. Ph. D. diss., Université de Paris XI.
- Pignatti S., 1995 - *Ecologia vegetale*. Ed UTET, Bologna.
- Pignatti S., 2003 – *Platanaceae*. *Flora d'Italia*. Edagricole, Volume 1:487. Bologna.
- Pignatti S., 2005 - *Biodiversità e aree naturali protette*. Ed ETS, Pisa.
- Piotto B., e Noi A. D., 2003 - *Propagation of Mediterranean Trees and Shrubs from Seed*. APAT, Roma, Italy.

- Pontini M. R., Bertini A., 2000 - Late Pliocene vegetation and climate in central Italy: High-resolution pollen analysis from the Fosso Bianco succession (Tiberino basin). *Geobios* 33: 519–526.
- Porebski Sue, L. Grant Bailey and Bernard R. Baum, 1997 - Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components." *Plant molecular biology reporter* 15.1: 8-15.
- Postigo-Mijarra J. M., Burjachs F., Gòmez Manzaneque F., Morla C., 2007 - A palaeoecological interpretation of the lower-middle Pleistocene Cal Guardiola site (Terrassa, Barcelona, NE Spain) from the comparative study of wood and pollen samples. *Rev Palaeobot Palyno* 146: 247–264.
- Postigo-Mijarra J. M., Manzaneque F. G., Morla C., 2008 - Survival and long-term maintenance of tertiary trees in the Iberian Peninsula during the Pleistocene: First record of *Aesculus* L. (*Hippocastanaceae*) in Spain. *Veg Hist Archaeobot* 17: 351–364.
- Postigo-Mijarra J. M., Morla C., Barròn E., Morales-Molino C., García S., 2010 - Patterns of extinction and persistence of Arctotertiary flora in Iberia during the Quaternary. *Rev Palaeobot Palyno* 162: 416–426.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000 - Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*; 155:945–959. PMID: 10835412.
- Quézel P., 1985 - Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. In Gomèz Campo (ed.), *Plant conservation in Mediterranean area*. D.L. Junk Publ., Dordrecht: 9 – 22.
- Quézel P., 1978 - Analysis of the flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65:479–534.
- Quézel P., and F. Médail, 2003 - *Ecologie et Biogéographie des Forêts du Bassin Méditerranéen*. Elsevier, Paris.
- Renault-Miskovsky J., Bui-Thi-Mai M., Girard M., 1984 - A propos de l'indigenat ou de l'introduction de *Juglans* et *Platanus* dans l'ouest de l'Europe au Quaternaire. *Rev Pale'obiol Special Issue*: 155–178.
- Richardson D. M., P. W. Rundel, S. T. Jackson, R. O. Teskey, J. Aronson, A. Bytnerowicz, M. J. Wingfield and Å. Prochešy, 2007 - Human impacts in pine forests: past, present, and future. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38:275–297.
- Rieseberg Loren Henry, and D. E. Soltis, 1991 - Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants." *Evolutionary Trends in Plants* 5.1: 65-84.
- Rodríguez-Sánchez F., and J. Arroyo, 2008 - Reconstructing the demise of Tethyan plants: climate-driven range dynamics of *Laurus* since the Pliocene. *Global Ecology and Biogeography* 17:685–695.

- Ronquist F., 1997 - Dispersal–vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 195–203.
- Rosati L., Masi A., Giardini M., Marignani M., 2015 - Under the shadow of a big plane tree: Why *Platanus orientalis* should be considered an archaeophyte in Italy." *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 149.1: 185-194.
- Rosen Walter G., 1986 - National Forum on BioDiversity, Washington D.C., 21-24 September.
- Rosenbaum G., G. S. Lister and C. Duboz, 2002a - Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *Journal of the Virtual Explorer* 8: 107–130.
- Rosenbaum G., G. S. Lister, and C. Duboz, 2002b - Relative motions of Africa, Iberia and Europe during Alpine orogeny. *Tectonophysics* 359:117–129.
- Rossi G., Montagnani C., Abeli T., Gargano D., Peruzzi L., Fenu G. et al., 2014 - Are Red Lists really useful for plant conservation? The New Red List of the Italian Flora in the perspective of national conservation policies. *Plant Biosyst* 148: 187–190.
- Rousset F., 1997 - Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Russo Ermolli E., Sardella R., Di Maio G., Petronio C., Santangelo N., 2010 - Pollen and mammals from the late Early Pleistocene site of Saticula (Sant'Agata de'Goti, Benevento, Italy). *Quatern Int* 225: 128–137.
- Russo Ermolli E., Romano P., Ruello M. R., Barone Lumaga M. R., 2014 - The natural and cultural landscape of Naples (southern Italy) during the Graeco-Roman and Late Antique periods. *J Archaeol Sci* 42: 399–411.
- Saccardo P. A., 1909 - Cronologia della Flora italiana. Tip. Seminario, Padova.
- Sadori L., Narcisi B., 2001 - The postglacial record of environmental history from Lago di Pergusa (Sicily). *Holocene* 11: 655–671.
- Sadori L., Ortu E., Peyron O., Zanchetta G., Vannièrè B., Desmet M. et al., 2013 - The last 7 millennia of vegetation and climate changes at Lago di Pergusa (central Sicily, Italy). *Clim Past* 9: 1969–1984.
- Sadori L., Zanchetta G., Giardini M., 2008 - Last Glacial to Holocene palaeoenvironmental evolution at Lago di Pergusa (Sicily, Southern Italy) as inferred by pollen, microcharcoal, and stable isotopes. *Quatern Int* 181: 4–14.
- Sadori L., Giardini M., Giraudi C., Mazzini I., 2010 - The plant landscape of the imperial harbour of Rome. *J Archaeol Sci* 37: 3294–3305.

- Sadori L., Allevato E., Bertacchi A., Boetto G., Di Pasquale G., Giachi G. et al., 2014 - Archaeobotany in Italian ancient Roman harbours. *Rev Palaeobot Palyno.* doi 10.1016/j.revpalbo.2014.02.004.
- Santangelo A., Caputo G., La Valva V., 1995 - L'Herbarium Neapolitanum. *Allionia*, 33: 103-120.
- Schuchert C., 1935 - Historical geology of the Antillean-Caribbean region. New York: John Wiley and Sons. Scientifica Sansoni, Milano.
- Schneider R., 1985 - Analyse palynologique dans l'Aspromonte en Calabre (Italie Meridionale). *Cahiers ligures de Prehistoire et de Protohistoire*, n.s. 2: 279–288.
- Shackleton N. J. & Opdyke N. D., 1973 - Oxygen isotope and palaeomagnetic stratigraphy of equatorial Pacific core 28-238: oxygen isotope temperatures and ice volumes on a 105 year and 106 year scale, *Quat.Res.*, 3, 39–55.
- Shi C., Hu N., Huang H., Gao J., Zhao Y.J. & Gao L. Z., 2012 - An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. *PLoS One*, 7(2).
- Shmida A. and M. J. A. Werger, 1992 - Growth form diversity on the Canary Islands. *Vegetatio* 102:183–199.
- Slatkin M., 15 may 1987- Gene flow and the geographic structure of natural population. *Nature*.
- Smith A. G, D. G. Smith, and B. M. Funnell, 1994 - Atlas of Mesozoic and Cenozoic coastlines. Cambridge: Cambridge University Press.
- Soltis Douglas E., Pamela S. Soltis, and Brook G. Milligan, 1992 - Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications." *Molecular systematics of plants*. Springer US 117-150.
- Soltis D. E., P. S. Soltis, M. W. Chase, M. E. Mort, D. C. Albach, M. Zanis, V. Savolainen, W. H. Hahn, S. B. Hoot, M. F. Fay, M. Axtell, S. M. Swensen, L. M. Prince, W. J. Kress, K. C. Nixon, and J. S. Farris, 2000 - Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcl*, and *atpB* sequences. *Botanical Journal of the Linnaean Society* 133: 381-461.
- Spicer R. A., J. A. Wolfe, and D. J. Nichols, 1987 - Alaskan Cretaceous-Tertiary floras and Arctic origins. *Paleobiology* 13: 73 83.
- Streff R., Ducouso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J. and Kremer A., 1999 - Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology*, 8: 831-841.
- Suc J. P., 1980 - Contribution à la Connaissance du Pliocène et du Pléistocène Inférieur des Régions Méditerranéennes d'Europe Occidentale par l'Analyse Palynologique des Dépôts du Languedoc-Roussillon (Sud de la France) et de la Catalogne (Nord-Est de l'Espagne). PhD Thesis. University of Montpellier II.

- Suc J. P., 1984 - Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* 307: 429–432.
- Sunding P., 1979 - Origins of the Macaronesian flora. In D. Bramwell (ed.), *Plants and Islands*, pp. 13–40. Academic Press, London.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G., Cosson J. F., 1998 - Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology* 7.4 (1998): 453-464.
- Targioni Tozzetti, 1853 - Cenni storici sulla introduzione di varie piante nell' agricoltura ed orticoltura Toscana. Tipografia Galileiana, Firenze.
- Templeton M., Clement D. Posada and K. A. Crandall, 2000 - TCS: a computer program to estimate gene genealogies, *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Tenore M., 1831 - 1842 – *Sylloge Plantarum Vascularium – Florae Neapolitanae*: 475. Stampa ex tipografia Fibreni. Napoli.
- Thompson R. S., 1991 – Pliocene environments and climates in the Western United States. *Quaternary Science Reviews* 10: 115-132.
- Thompson J. D., Lavergne S., Affre L., Gaudeul M., Debussche M., 2005 - Ecological differentiation of Mediterraneanan endemic plants. *Taxon*, 54: 967–976.
- Thompson J. D., 2005 - *Plant Evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford.
- Tiffney B. H., Manchester S. R., 2001 - The use of geological and paleontological evidence in evaluating plant phylogeographic hypotheses in the northern hemisphere tertiary. *International Journal of Plant Sciences* 162: S3-S17.
- Tiffney B. H., 1985a - Perspectives on the origin of the floristic similarity between eastern Asia and eastern North America. *Journal of the Arnold Arboretum* 66: 73–94.
- Tiffney B. H., 1985b - The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in Tertiary and modern phylogeography of the Northern Hemisphere. *Journal of the Arnold Arboretum* 66: 243–273.
- Tinner W., van Leeuwen J. F. N., Colombaroli D., Vescovi E., van der Knaap W. O., Henne P. D., et al., 2009 - Holocene environmental and climatic changes at Gorgo Basso, a coastal lake in southern Sicily, Italy. *Quat Sci Rev* 28: 1498–1510.
- Triboush S. O., N. G. Danilenko and O. G. Davydenko, 1998 - A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower." *Plant molecular biology reporter* 16.2: 183-183.
- Tschan G. F., Denk T., von Balthazar M., 2008 - *Credneria* and *Platanus* (Platanaceae) from the Late Cretaceous (Santonian) of Quedlinburg, Germany. *Rev Palaeobot Palyno* 152: 211–236.

- Tulin T. G., Edmondson J. R., 1993 – Platanaceae. In: Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (eds.), 1993 – Flora Europea. ed. 2. vol. 1: 463. University press, Cambridge UK.
- Van Dam J. A., 2006 - Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12-3 Ma) aridification of Europe: the use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 238: 190 – 218.
- Van Leeuwen J. F., Scha fer H., Van der Knaap W. O., Rittenour T., Bjo rk S., Ammann B., 2005 - Native or introduced? Fossil pollen and spores may say. An example from the Azores Islands. *Neobiota* 6: 27–34.
- Van Zeist W., Baruch U., Bottema S., 2009 - Holocene palaeoecology of the Hula area, northeastern Israel. In: Kaptijnand E., Petit L. P., editors. *A Timeless Vale. Archaeological and related essays on the Jordan Valley in honour of Gerrit Van Der Kooij on the occasion of his sixty-fifth birthday.* Archaeological Studies Leiden University. Leiden: Leiden University Press. pp. 29–64.
- Velitzelos E., Kvacek Z., Velitzelos D., 2002 - New Oligocene leaf floras from the volcanic complex of the Evros Mountains. 6th European Paleobotany – Palynology Conference Athens, Greece 2002. pp. 185–186.
- Velitzelos E., Teodoridis V., Kvac ek Z., Velitzelos D., 2002 - Plio-Pleistocene flora from Archangelos, Rhodes Island, Greece. 6th European Palaeobotany – Palynology Conference Athens, Greece 2002. pp. 184–185.
- Velitzelos D., Bouchal J. M., Denk T., 2014 - Review of the Cenozoic floras and vegetation of Greece. *Rev Palaeobot Palyno* 204: 56–117.
- Velitzelos E., Gregor H. J., 1990 - Some aspects of the Neogene floral history in Greece. *Rev Palaeobot Palyno* 62: 291–307.
- Vos Pieter et al., 1995 - AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic acids research* 23.21: 4407-4414.
- Webb T. & Bartlein P. J., 1992 - Global changes during the last 3 million years *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 141–173.
- Weir B. S. and Cockerham C. C., 1984 - Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wen J., 1999 - Evolution of eastern Asian and eastern North American disjunct distributions in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 421–455.
- Wen J., 2001 - Evolution of eastern Asian and eastern North American biogeographic disjunctions: a few additional issues. *International Journal of Plant Sciences* 162: S117–S122.

- White J. M., Ager T. A., Adam D. P., Leopold E. B., Liu G., Jette H. et al., 1997 - An 18 million year record of vegetation and climate change in north-western Canada and Alaska: tectonic and global climatic correlates. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 130: 293–306.
- Wick L., Lemcke G., Sturm M., 2003 - Evidence of late glacial and Holocene climatic change and human impact in eastern Anatolia: High-resolution pollen, charcoal, isotopic and geochemical records from the laminated sediments of Lake Van, Turkey. *Holocene* 13: 665–675.
- Williams D. A., Wang Y. Q., Borchetta M. et al., 2007 - Genetic diversity and spatial structure of a keystone species in fragmented pine rockland habitat. *Biological conservation* 138 (1-2): 256-268.
- Wilson E. O., 1999 - Biodiversità. La violenza della natura, la resistenza della vita, Biblioteca.
- Wolfe J. A., 1994 - An analysis of Neogene climates in Beringia. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 108: 207–216.
- Wolfe J. A., 1975 - Some aspects of plant geography of the Northern Hemisphere during the late Cretaceous and Tertiary. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 264-279.
- Wood Jr C. E., 1972 - Morphology and phytogeography: the classical approach to the study of disjunctions. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 59: 107–124.
- Wright S., 1943 - Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.
- Wright S., 1946 - Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31:39-59.
- Wright S., 1951 - The genetical structure of populations. *Ann Eugenics*, 15, 323-354.
- Xiang Q. Y., Manchester S. R., Thomas D. T., Zhang W. H., Fan C. Z., 2005 - Phylogeny, biogeography, and molecular dating of Cornelian cherries (*Cornus*, Cornaceae): tracking Tertiary plant migration. *Evolution* 59: 1685–1700.
- Xiang Q. Y., Soltis D. E., Soltis P. S., Manchester S. R., Crawford D. J., 2000 - Timing the eastern Asian–eastern North American floristic disjunction: molecular clock corroborates paleontological estimates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 462–472.
- Yaltirik F., 1983 – *Platanaceae*. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edited by Davis P.H. Edinburgh University press, Vol. 7:655 – 656.
- Yon D. et Tendron G., 1981 - Alluvial forests of Europe. Council of Europe, 65 pp.
- Zane L., L. Bargelloni and T. Patarnello, 2002 - Strategies for microsatellite isolation: a review." *Molecular ecology* 11.1: 1-16.
- Ziegenhagen B., P. Guillemaut, and F. Scholz, 1993 - A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.)." *Plant molecular biology reporter* 11.2: 117-121.
- Zogaris S., Chatzinikolau Y., Dimopoulos P., 2008 - Riparian woodland flora in upland rivers of Western Greece. *Mediterranean Marine Science*, 9(2): 87-102.

- Zohary D., 1983 - Wild genetic resources of crops in Israel. *Israel Journal of Botany* 32:97–100.
- Zohary M., 1962 - *Plant Life in Palestine*. Ronald Press, New York.
- Zohary M., 1973 - *Geobotanical Foundations of the Middle East*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.