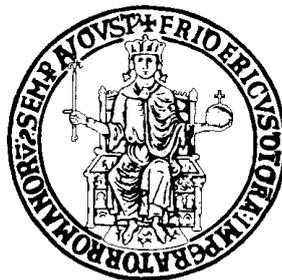


UNIVERSITA' DI NAPOLI "FEDERICO II"



SCUOLA DI DOTTORATO IN BIOLOGIA

XXXIV Ciclo

**Ambienti estremi e piante vascolari: la  
popolazione di *Genista tinctoria* L. delle Mefite  
della Valle d'Ansanto.**

**Coordinatore**

Ch.mo Prof. Sergio Esposito

**Supervisor**

Ch.ma Dr.ssa Olga De Castro

**Ph.D. student**

Emanuela Di Iorio

Anno Accademico 2020 - 2021

# INDICE

Sinossi	4
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>INTRODUZIONE</b>	
1.1	Gli ambienti estremi 8
1.2	Le Mefite della Valle d'Ansanto 9
1.3	Fabales 14
1.4	<i>Genista</i> L. 17
1.5	<i>Genista tinctoria</i> L. 20
<b>CAPITOLO 2</b>	
<b>STRUMENTI D'INDAGINE</b>	
2.1	Il DNA plastidiale 25
2.1.1	La regione <i>trnL</i> <sup>(UAA)</sup> - <i>trnF</i> <sup>(GAA)</sup> 25
2.1.2	Lo spaziatore intergenico <i>petB</i> - <i>petD</i> 26
2.2	Il DNA nucleare 27
2.2.1	I microsatelliti (nrSSR) 27
<b>CAPITOLO 3</b>	
<b>MATERIALI E METODI</b>	
3.1	Campionamento 31
3.2	Estrazione del DNA 33
3.3	Sequenziamento: amplificazione e sequenziamento dei marcatori plastidiali 34
3.3.1	Analisi dei dati 35
3.4	Genotipizzazione: amplificazione e sequenziamento delle regioni microsatellitari 37
3.4.1	Analisi dei dati 39
3.5	Il flusso genico: polline vs seme 44
<b>CAPITOLO 4</b>	
<b>RISULTATI</b>	

4.1	Analisi del DNA plastidiale	46
4.1.1	Relazione tra gli aplotipi	46
4.1.2	Diversità genetica e struttura della popolazione	47
4.2	Analisi dei microsatelliti	50
4.2.1	Diversità genetica e struttura della popolazione	52
4.2.2	Storia demografica	55
4.3	Il flusso genico: polline vs seme	56
<b>CAPITOLO 5</b>		
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONE</b>		58
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		67
<b>APPENDICE</b>		
A.1	I noduli radicali	81
A.2	I Rizobi	83
A.3	Il DNA dei batteri nodulatori	85
A.3.1	Il gene <i>16S</i> rRNA	86
A.3.2	Il gene <i>nodC</i>	87
A.3.3	Il gene <i>nifH</i>	87
A.4 MATERIALI E METODI		
A.4.1	Campionamento	89
A.4.2	Isolamento delle colonie batteriche ed estrazione del DNA	90
A.4.3	Amplificazione e sequenziamento dei geni <i>16S</i> rRNA, <i>nodC</i> e <i>nifH</i>	91
A.4.3.1	Analisi dei dati	92
A.5	Risultati e discussione	93
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		95
<b>ELENCO PUBBLICAZIONI</b>		100

## Sinossi

Le Mefite della Valle d'Ansanto sono caratterizzate da fenomeni geologici che prevedono un lento rilascio in atmosfera di gas endogeni a bassa temperatura, definiti "mofete". Questo luogo, localizzato in sud Italia, è riconosciuto come tossico ed inospitale da oltre duemila anni a causa delle micidiali emissioni ad alta concentrazione di CO<sub>2</sub>, mista a ridotte concentrazioni di N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S e CH<sub>4</sub> ( $\leq 2\%$ ), attualmente è conosciuto anche come il sito non vulcanico a maggiore emissione di CO<sub>2</sub> al mondo. Poche specie vegetali riescono a sopravvivere in queste condizioni estreme di tossicità, tra queste una popolazione aberrante di *Genista tinctoria* L., descritta storicamente come *G. anxantica* Ten., sebbene oggi i taxa siano riconosciuti come sinonimi.

L'obiettivo principale di questo studio è quello di comprendere le possibili conseguenze che un ambiente estremo, come questo delle Mefite, possa avere sulle piante vascolari, prendendo come sistema modello in piccola scala la popolazione di *Genista tinctoria*, che per comodità di esposizione è riportata nel testo come *G. tinctoria* delle Mefite. A tal scopo, oltre agli individui della suddetta popolazione, sono state campionate diverse popolazioni di *G. tinctoria* localizzate a diverse distanze dalle emissioni gassose. Sono state condotte analisi molecolari utilizzando due tipologie di marcatori molecolari: marcatori ad ereditarietà uniparentale (cpDNA) e marcatori ad ereditarietà biparentale (nrSSR) per rispondere alle seguenti domande: 1) la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite è un'entità geneticamente distinta? 2) In che modo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite si rapporta con le popolazioni limitrofe? Se c'è un'entità distinta nella Mefite, (3) dovrebbe essere trattata come un taxon separato? E, infine, (4) quanto un ambiente di questo tipo può aver influito sulla differenziazione della popolazione delle Mefite da quelle limitrofe?

Dai risultati ottenuti attraverso l'analisi del DNA plastidiale e nucleare, oltre che dallo studio in campo eseguito sulle popolazioni campionate, la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite mostra segni di differenziazione genetica, oltre che di barriere al flusso genico rispetto alle popolazioni circostanti di *G. tinctoria*. Ci sono prove sufficienti nei dati genetici per mostrare che c'è un processo evolutivo in corso nella popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, il che è una conseguenza dell'ambiente estremo in cui vive questa popolazione, supponendo la possibilità di definire tale entità un ecotipo, se non addirittura un'entità tassonomica a sé stante.

Un altro quesito scientifico è stato sviluppato durante le diverse campagne di campionamento condotte presso le Mefite, i cui avanzamenti vengono riportati in appendice, dato lo stato preliminare dei risultati dovuto alla crisi pandemica. Il quesito scientifico è il seguente: qual è la relazione tra la componente batterica dei noduli radicali di *G. tinctoria* delle Mefite e l'ambiente mefitico, ovvero vi sono differenze tassonomiche tra i batteri nodulatori di *G. tinctoria* delle Mefite e le popolazioni limitrofe? A tale scopo è stato utilizzato il marcatore universale 16S rRNA, che ha portato al riconoscimento dei ceppi batterici isolati in *G. tinctoria* delle Mefite e nelle popolazioni limitrofe. Una volta caratterizzati, i soli ceppi appartenenti al genere *Bradyrhizobium* Jordan 1982, sono stati analizzati attraverso marcatori molecolari specifici per i geni nodulatori (*nod*) e per i geni deputati all'azotofissazione (*nif*), per verificare una possibile variabilità. I risultati ottenuti per i batteri nodulatori, al momento, non suggeriscono una differenza significativa tra i ceppi batterici isolati dai noduli della popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite e le popolazioni limitrofe di *G. tinctoria*.

The Mefite of the Ansanto Valley are characterized by geological phenomena that involve a slow release of endogenous gases into the atmosphere at low temperatures, these phenomena are defined as "mofete". This place, located in southern Italy, has been recognized as toxic and inhospitable for over two thousand years, due to the deadly high concentration CO<sub>2</sub> emissions, mixed with low concentrations of N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S and CH<sub>4</sub> ( $\leq 2\%$ ), currently it is also known as the non-volcanic site with the highest CO<sub>2</sub> emissions in the world. Few plant species manage to survive in these extreme conditions of toxicity, among these there is an aberrant population of *Genista tinctoria* L., historically described as *G. anxantica* Ten., even if today the taxa are regarded as synonyms.

The main objective of this study is to understand the possible consequences that an extreme environment, such as at Mefite, may have on vascular plants, taking the population of *G. tinctoria* as a small-scale model system. For this purpose, in addition to the individuals of the previously mentioned population, some populations of *G. tinctoria* were sampled, located at different distances from the gaseous emissions. Molecular analyses were conducted using two types of molecular markers: markers with uniparental inheritance (cpDNA) and with biparental inheritance (nrSSR) to answer the following questions: 1) is the

population of *G. tinctoria* from the Mefite genetically distinct? 2) How does the *G. tinctoria* from the Mefite population relate to the neighbouring populations of *G. tinctoria*? If there is a distinct unit in Mefite, (3) should *G. tinctoria* from the Mefite be treated as a separate taxon? And, finally, (4) how much an environment of this type could have influenced the differentiation of the populations of *G. tinctoria* from the Mefite from neighbouring populations?

From the results obtained through the analysis of plastid and nuclear DNA, as well as from the field study performed on the populations, the population of *G. tinctoria* from Mefite shows concrete signs of genetic differentiation, as well as barriers to gene flow with respect to the surrounding populations of *G. tinctoria*.

There is sufficient evidence in the genetic data to demonstrate that an evolutionary process is underway in *G. tinctoria* present among Mephitis, which is a consequence of the extreme environment in which this population lives, assuming the possibility of defining this unit as an ecotype, if not a distinct taxon.

Another scientific question was developed during the various sampling campaigns conducted at the Mefite, the progress of which is reported in the appendix, given the preliminary state of the results due to the pandemic crisis.

The scientific question is: what is the relationship between the bacterial component of the root nodules of *G. tinctoria* of Mefite and the mephitic environment, that is, are there taxonomic differences between the nodulatory bacteria of *G. tinctoria* from Mefite and the bacteria of neighbouring populations?

For this purpose, the universal marker *16S* rRNA was used, which led to the recognition of bacterial strains isolated in *G. tinctoria* from Mefite and in neighbouring populations. Once characterized, the only strains belonging to the genus *Bradyrhizobium* Jordan 1982, were analysed through specific molecular markers for the nodulator genes (*nod*) and for the nitrogen-fixing genes (*nif*), to verify a possible variability. Currently, the results obtained for nodulatory bacteria do not suggest a significant difference between the bacterial strains isolated from the nodules of the *G. tinctoria* from Mefite and the neighbouring populations.

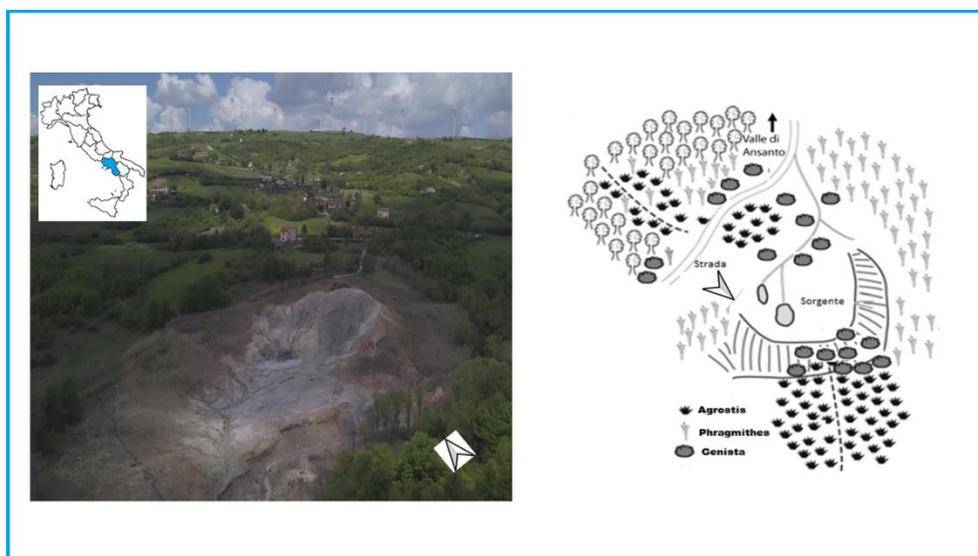
**CAPITOLO 1**  
**INTRODUZIONE**

## 1.1 Gli ambienti estremi

Gli ambienti estremi sono habitat caratterizzati da dure condizioni chimico-fisiche, che includono alte e basse temperature, alte pressioni, radiazioni, acidità, alcalinità e alta salinità. Queste condizioni non permettono la sopravvivenza della stragrande maggioranza degli organismi viventi (Gomez, 2011). Molti ambienti presenti sul nostro Pianeta sono caratterizzati da condizioni estreme, che fino a qualche decennio fa si riteneva fossero proibitive per la vita. Oggi, con le nuove tecnologie, si è potuto sondare la presenza di molti organismi, prevalentemente unicellulari, capaci di condurre la propria sopravvivenza sfidando queste condizioni. Questi ultimi vengono definiti organismi estremofili (MacElroy, 1974). A partire dalla scoperta via via sempre più numerosa di organismi capaci di sopravvivere in condizioni estreme, anche il concetto di ambiente estremo si è allargato. Oggi si ritiene giustificabile parlare di ambiente estremo anche quando ci si riferisce ad ambienti in cui vi sono condizioni estreme nutrizionali, di densità di popolazione, di parassiti, prede e così via (Rothschild & Mancinelli, 2001). Molto spesso può accadere che, contemporaneamente, differenti caratteristiche estreme si verifichino in uno stesso ambiente, come nelle sorgenti di acque calde o geysir, dove quantità significative di composti chimici tossici sono concomitanti ad alte temperature (Cowan et al., 2012). Allo stesso modo, le sorgenti naturali fredde di CO<sub>2</sub> rappresentano un ambiente estremo molto interessante, in quanto favoriscono la presenza e l'abbondanza di organismi estremofili. Questi siti di sfiato, chiamati mofete, rappresentano laboratori unici sul campo in cui è possibile valutare l'effetto di alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> sugli ecosistemi su una scala temporale lunga (Miglietta et al., 1993, Onoda, 2007). Anche se la maggior parte degli studi contestualizzati in questi ambienti sono indirizzati sulle piante (Bettarini et al., 1998, Marzaioli et al.; 2005), non mancano studi sulla comunità edafica del suolo (Raven, 1964; Kruckeberg, 1986). Gli ambienti arricchiti di CO<sub>2</sub> possono risultare interessanti anche perché possono essere considerati una riproduzione moderna dell'atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> del passato (Paoletti et al., 2005) nonché un modello di laboratorio sul campo che simula l'aumento del livello di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera dovuto al cambiamento climatico, per valutarne il possibile impatto sulla vegetazione nel futuro, anche se non è ancora dimostrato che questa risposta vi sia nelle piante (Walker et al., 2020).

## 1.2 Le Mefite della Valle d'Ansanto

Nella catena appenninica dell'Italia meridionale, tra Rocca San Felice, Frigento e Villamaina (Avellino, Irpinia Centrale, Campania) si trova un ambiente estremo denominato Mefite nella piccola Valle dei Bagni, all'interno dell'ampia Valle d'Ansanto (Abatino & De Simone, 1974, Gambino, 1991, Sisto et al., 2020) (Fig.1).



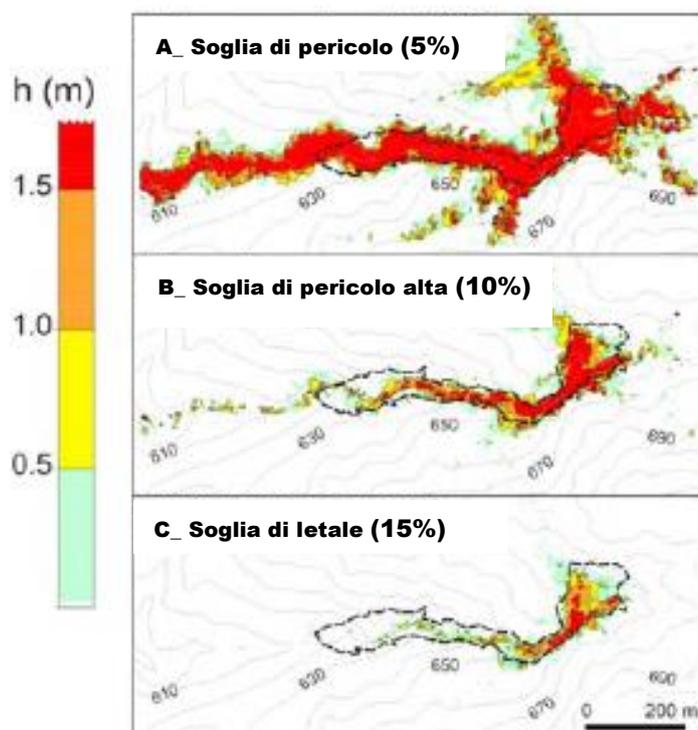
**Figura 1:** A sinistra: localizzazione delle Mefite della Valle d'Ansanto; a destra: localizzazione schematica delle piante vascolari presenti presso le Mefite (Haworth et al., 2010).

In questo luogo è presente sia la più grande emissione non vulcanica di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) fredda della Terra, sia un antichissimo santuario costruito intorno al VII secolo d.C., che raggiunse il suo massimo splendore tra il V-VI secolo d.C. (Gambino, 1991; Mele, 2008; Chiodini et al., 2010; Sisto et al., 2020). La presenza di emissioni gassose pestifere portò alla costituzione di un tempio italico dedicato alla dea *Mephitis* (Santoli, 1783; Galdi, 1931; Gambino, 1991; Mele, 2008), come ricorda anche Plinio nella sua *Naturalis Historia* (77-78 d.C.). La divinità, inizialmente benigna e protettrice, e legata alle acque e simbolo di fertilità dei campi, si trasformò nel corso del tempo in spirito maligno, a causa delle letali emissioni gassose del luogo. Infatti, sono molte le testimonianze, dall'antichità ad oggi, che sottolineano l'atmosfera infernale della zona, un esempio si riscontra nel VII libro dell'Eneide, in cui l'autore mette in luce la sacralità del sito e colloca in quel punto preciso la discesa agli Inferi (Virgilio, 29-19 a.C.); o, nel *De divinatione* (Cicerone, 44 a.C.), dove la località era sinonimo di morte. Oggi la tossicità del sito è chiaramente attribuita ad emissioni di CO<sub>2</sub> miste ad altre sostanze volatili [azoto

(N<sub>2</sub>), acido solfidrico (H<sub>2</sub>S) e metano (CH<sub>4</sub>)] (Duchi et al., 1994; Minissale, 2004; Chiodini et al., 2010).

Le Mefite occupano suoli di natura argilloso-calcareo ed un'area rettangolare nella Valle dei Bagni. Il rettangolo risulta essere rialzato nella parte nord e delimitato a est e ad ovest da due piccoli rigoli completamente asciutti nel periodo estivo. Tra i due rigoli si riscontra la presenza di uno stagno di fango freddo (18,5-23,9 °C, Battaglini & Totaro-Aloj, 1973; Totaro-Aloj, 1973) che ribolle per le elevate pressioni con le quali le emissioni gassose vengono sprigionate; successivamente i due rigoli convergono sul lato sud-ovest e si riversano nel torrente Bagni, che costeggia il colle di S. Felicità e divide la Macchia Mefitica. A pochi metri dall'unione dei due rigagnoli, il torrente Bagni si allarga: questo punto viene definito "Vado Mortale", sia perché è un tratto lungo e molto profondo e, quindi, pericoloso da attraversare, sia perché in questo punto si addensano alte concentrazioni di fumi tossici (Santoli, 1783, Macchia, 1838, Gambino, 1991). Il torrente Bagni taglia a metà la piccola valle e, da quanto riportato da Gambino (1991), un tempo questo doveva avere sponde alte e strapiombanti, ma con la distruzione del bosco e la coltivazione dei campi sovrastanti, la sponda sinistra ha subito un movimento di frana di proporzioni significative. In passato, la terra su cui si trova la Mefite era invasa dall'acqua, formando un lago in cui erano presenti le emissioni di gas che la facevano bollire in alcuni punti e durante i periodi di siccità si formavano due laghi corrispondenti (Di Capua, 1683; Santoli, 1783; Macchia, 1838). Dal novembre 1732 sono state osservate profonde modificazioni della struttura del lago dovute a fenomeni geologici parossistici sotterranei (Santoli, 1783), determinando, poi, la conformazione dell'attuale sito delle Mefite d' Ansanto (Galdi, 1931; Abatino & De Simone, 1974) (Fig.1). Oggi la Mefite ha un aspetto desolato e spettrale, quasi lunare, la cui origine tettonica è derivata dalle fasi di sollevamento della catena appenninica nel Pleistocene (Cinque et al., 1993; Improta et al., 2014) ed è caratterizzata da un'imponente area di emissione di gas non vulcanico rilasciato costantemente a temperatura ambiente (Duchi et al. 1994; Manzi, 1997; Minissale, 2004; Chiodini et al., 2010) entrando anche in contatto con acque profonde dei Monti Picentini (Ortolani et al., 1981). Nella zona di massima emissione, i gas formano una pozza di fango ribollente; da questa pozza si genera un fiume di gas (Fig. 2), che scende a valle seguendo il percorso parallelo del torrente Bagni, che è formato dall'unione di altri due piccoli rivoli ai lati della pozza

di fango. Le emissioni sono composte da N<sub>2</sub> non atmosferico (ca. 1,3%), H<sub>2</sub>S (ca. 0,33%), CH<sub>4</sub>, (ca. 0,23%), mentre la quasi totalità è rappresentata da CO<sub>2</sub> (ca. 98%) e sono legate a fenomeni sedimentari e tettonici (Chiodini et al., 2010; Pischiutta et al., 2013; Sisto et al., 2020). L'emissione giornaliera di CO<sub>2</sub> misurata vicino alla sorgente corrisponde a circa 2000 t/giorno o 730.000 t/m<sup>2</sup>/anno (Chiodini et al., 2010). Sebbene ci siano ancora discussioni sulla quantità precisa di emissioni, questo è considerato il sito con più alte emissioni di CO<sub>2</sub> finora misurate in ambiente non vulcanico (Sisto et al., 2020).



**Figura 2:** Mappa delle distribuzioni dei gas con valori massimi delle soglie di CO<sub>2</sub>, che variano rispetto alla velocità ed alla direzione del vento. L'area delimitata dalla linea tratteggiata indica vegetazione assente o danneggiata (Chiodini et al., 2010).

Il fango ribollente e il terreno circostante presentano un pH molto basso (< 2,15 e 2,5 , Battaglini & Totàro-Aloj, 1973; De Castro et al., comunicazione personale) con una forte componente gessoso-solfifera e una notevole concentrazione di solfati, fosfati, nitrati, calcio e ammonio (Totàro-Aloj, 1973). La pericolosa concentrazione di CO<sub>2</sub> accompagnata dalla dannosa quantità di H<sub>2</sub>S rende la parte più interna della Mefite priva di gran parte della vita e potenzialmente mortale per gli esseri viventi (Di Capua, 1683; Santoli, 1783; Brocchi, 1820; Macchia, 1838; Maiuri, 1953; Gambino, 1991; Sisto et al., 2020; Fig. 2).

Gli studi sugli organismi che potenzialmente possono sopravvivere in questa particolare nicchia ecologica ad oggi sono pochi e vetusti. Per quel che riguarda la componente microbica nella pozza di fango delle Mefite e nel suolo circostante, è stato effettuato un primo studio da Totàro-Aloj (1973), nel quale si evidenzia la presenza di batteri litotrofi, actinomiceti ed alghe unicellulari specialiste di questi ambienti e pionieri prima della comparsa di forme di vita pluricellulare. Recentemente, è stato condotto uno studio simile, ma utilizzando nuove tecniche avanzate per analizzare nel fango e nel terreno circostante sia i microrganismi (tramite *Next Generation Sequencing*) sia i componenti chimici (tramite *Plasma-Mass Spectrometry e Ion Chromatography*) (De Castro et al., sottomesso).

Studi sulla componente algale hanno evidenziato la presenza di alcune alghe unicellulari di ambienti estremi come *Viridiella friedericiana* Albertano, Pinto & Taddei (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Ochromonas vulcania* Gromov (Chrysophyceae, Heterokonta), *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler e *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola (Cyanidiophyceae, Rhodophyta) (Totàro-Aloj, 1973; Albertano et al., 1994; Pinto et al., 1992).

Studi sulla fauna del suolo hanno evidenziato la presenza di invertebrati [artropodi (es. collemboli, acari oribatidi, zecche dure), insetti (es. coleotteri, ditteri, embiotteri, imenotteri, odonati, psocotteri), nematodi e tardigradi] sia a monte sia sulle sponde della sorgente mefitica, mentre a valle si riscontra un netto calo della biodiversità, molto probabilmente dovuto alla maggiore concentrazione di fumi tossici che corrono lungo il torrente Bagni (Battaglini & Totàro-Aloj, 1973; Battaglini & Arcamone, 1981; Battaglini & Carbone, 1981).

Per quanto riguarda le piante vascolari non esistono studi esaurienti, sebbene l'area fosse stata già indagata all'inizio dell'Ottocento da Giovanni Gussone per la presenza di una particolare popolazione di *Genista* (Macchia, 1838) descritta successivamente come *G. anxantica* Ten. (Tenore, 1820). Uno studio su *Agrostis canina* L., anch'essa presente nei pressi del vallone mefitico (Fig.1), è stato condotto recentemente da Haworth et al. (2010), per valutare la possibilità che le esalazioni gassose presenti nel sito delle Mefite (nello specifico CO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>) ne abbiano influenzato lo sviluppo degli stomi.

Come riportato in una nota di Totàro-Aloj in Gambino (1991), negli anni Cinquanta del secolo scorso fu pianificato, e in parte realizzato, un intervento di consolidamento dovuto al dissesto geologico dell'area, dove erano presenti i torrenti

di Rocca San Felice, che generarono frane, erosioni e smottamenti. Le opere di consolidamento hanno determinato un notevole cambiamento dell'ambiente naturale con l'imbrigliamento dei corsi d'acqua, la regolazione delle acque piovane con erba e opportuni canali di scolo, il rimboschimento di ampie fasce laterali e vincoli idrologici per i campi nelle aree a rischio. Tale opera di consolidamento è stata eseguita in parte anche nella Valle d'Ansanto, ma solo per la parte del colle di S. Felicità che confina con il sito della Mefite ed escludendo così tutta l'area del sito della Mefite. Tale esclusione fu fortemente consigliata da Giovanni Oscar Onorato che, tra il 1953 e il 1960, diresse i lavori di scavo archeologico per conto della Soprintendenza Archeologica di Napoli nell'area tossica delle Mefite (Onorato, 1960). Secondo questo autore, tali opere di consolidamento avrebbero pesantemente manomesso l'area delle Mefite dal punto di vista naturalistico (Gambino, 1991). Come riportato da Totaro-Aloj in Gambino (1991), molte coltivazioni limitrofe sono state ormai abbandonate e si presume che buona parte di esse stiano tornando ad essere boschi com'erano prima che i luoghi diventassero il regno dei pastori dediti alla pastorizia. Sembra infatti che, i feudatari romani e poi quelli medievali bruciassero gli alberi per far crescere l'erba da pascolo ed anche dai "Capitoli Comunali" dei secoli XV-XVII si intuisce chiaramente che il terreno più vicino al centro abitato era intensamente coltivato a vigneto e frutteto (tutti recintati con siepi o muretti a secco) e le terre più lontane adibite a pascolo, come per la zona delle Mefite d'Ansanto (Gambino, 1991).

### 1.3 Fabales

Le Fabales rappresentano un ordine di organismi vegetali a cui appartengono 762 generi ed oltre 20.400 specie (Stevens, 2001). Queste ricoprono un grande interesse sia dal punto di vista scientifico che sotto il profilo economico. Sono presenti in tutti gli habitat: dalle foreste pluviali ai deserti e nelle zone temperate; possiedono un habitus altrettanto variabile, dall'arboreo nelle zone tropicali, all'erbaceo e arbustivo nelle zone temperate (Judd et al., 2019). L'origine monofiletica di tale ordine è supportata da sequenze nucleari e plastidiali (Bello et al., 2009-2012; Källersjö et al., 1998, Savolainen et al., 2000; Wang et al., 2009) e le sinapomorfie morfologiche possono essere ricondotte alle seguenti caratteristiche: elementi vasali con perforazioni semplici, punteggiature visturate, petali con unghia ed embrioni verdi voluminosi (Judd et al., 2019). Le famiglie principali sono 3: Fabaceae, Surianaceae e Polygalaceae, anche se queste ultime sono probabilmente il sister group dei restanti membri dell'ordine (Bello et al., 2012).

La famiglia delle Polygalaceae ha un'ampia diffusione che va dalle regioni tropicali a quelle temperate, con oltre 21 generi e 850 specie (Judd et al., 2019). Alcune specie vengono coltivate per uso ornamentale come *Polygala* L. e *Securidaca* (L.) Degen & Dörfl. I fiori a simmetria bilaterale (Cronquist 1981) hanno fatto sì che venissero considerate per molto tempo affini alle Malpighiaceae o alle Krameriaceae; solo le analisi di sequenza del DNA le hanno collocate nell'ordine delle Fabales. I fiori della maggior parte delle specie appartenenti a tale famiglia, sono molto simili a quelli delle leguminose faboidi, ma gli elementi che li compongono non sono omologhi. Questi attraggono diverse specie di vespe ed api, sono note anche modalità di autoimpollinazione che si realizza mediante l'incurvamento dello stilo o in seguito ai movimenti del ramo stilare, provvisto di un ciuffo di peli (Judd et al., 2019).

La famiglia delle Surianaceae ha una diffusione prevalentemente pantropicale, con prevalenza in Australia, Messico e nella Penisola di Osa (Stevens, 2001). La famiglia conta, ad oggi, 5 generi, di cui tre endemici dell'Australia, e 8 specie. Data la particolare distribuzione, ad oggi questa famiglia è ancora poco studiata sia dal punto di vista vegetativo che dal punto di vista chimico.

La famiglia delle Fabaceae è diffusa in tutto il mondo con oltre 750 generi e 19.500 specie. Si tratta della terza famiglia più grande al mondo per quel che riguarda il numero di taxa dopo Asteraceae e Orchideaceae e la seconda più importante dal

punto di vista economico, dopo la famiglia delle Poaceae. Le leguminose sono fonte di cibo, di pascolo e fieno, di gomma di Guar ed altre gomme, legno e fibre di lusso (Judd, 2019). È ben documentato che i membri appartenenti alla famiglia delle Fabaceae presentano relazioni simbiotiche con batteri radicali, detti Rhizobia, batteri del suolo capaci di formare noduli sulle radici e, in alcuni casi, sui fusti delle leguminose, nei quali avviene il fenomeno della fissazione del N<sub>2</sub> atmosferico (Evans & Russell, 1971). Tra i batteri e la pianta ospitante si instaura una simbiosi mutualistica che rende le piante indipendenti nell'approvvigionamento del N<sub>2</sub> atmosferico, un importante macronutriente (Vance, 1998). La fissazione dell'azoto è assente in molte linee precocemente divergenti, motivo per il quale questa va considerata come una omoplasia e non una sinapomorfia (Judd et al., 2019). I fiori papilionati sono raccolti in infiorescenze a capolino o racemi, raramente solitari (*Cytisus* L.) (Frodin & Heywood, 1968), con calice gamosepalo sormontato da cinque denti. La corolla, pentamera e dialipetala, è costituita da un grande petalo, denominato vessillo, circondato da due ali ai lati, che hanno come scopo quello di aumentare le dimensioni del fiore; inferiormente c'è la carena costituita da due petali più o meno fusi al margine inferiore, che hanno la funzione di piano d'appoggio per gli insetti impollinatori e racchiudono 10 stami monoadelfi o diadelfi ed il gineceo, con il caratteristico ovario supero monocarpellare uniloculato. L'impollinazione è affidata a insetti non specifici che hanno come ricompensa fornita dal fiore quasi esclusivamente il polline, dato che la presenza di nettare non è molto frequente (Etcheverry et al., 2008). Le foglie nelle specie più arcaiche sono composte imparipennate; da queste si considerano derivate tutte le altre morfologie fogliari: digitate, trifogliate e semplici. Sono presenti stipole disposte in modo opposto alle foglie o raramente fuse a circondare il fusto. Il legume ha un'enorme importanza nel riconoscimento dei generi e può essere plurispermo o monospermo, con semi che possono avere dimensioni dai pochi millimetri a diversi centimetri. L'apertura del legume può essere sia dorsicida che ventricida, la dispersione può avvenire per mezzo di un meccanismo a pressione, o per mezzo di vettori animali. I semi sono protetti da un tegumento esterno poco permeabile all'acqua, che ne garantisce la vitalità e ne ritarda la germinazione; sono ricchi di sostanze di riserva all'interno dei cotiledoni, nello specifico di diverse proteine e grassi. In alcuni casi, come in quello riguardante il genere *Lupinus* L.,

sono stati riscontrati numerosi alcaloidi che rendono tali piante tossiche (Wink et al., 1995).

#### 1.4 *Genista* L.

Il genere *Genista* L., appartenente alla famiglia delle Fabaceae, è diffuso in tutta l'area Mediterranea e in tutte le regioni ad essa prossime; raggiunge a Nord l'Europa settentrionale e ad Est il Caucaso e poco oltre (Gibbs, 1966). Nella parte occidentale dell'areale, la penisola Iberica, si riscontra un maggior numero di specie appartenenti a questo ampio genere. Per quanto riguarda invece la regione orientale, la più alta concentrazione di taxa è riscontrabile nella penisola balcanica. Il genere è anche diffuso in buona parte dell'Europa occidentale e centrale, estendendosi fino a sud-est di quella che era l'ex U.R.S.S. ed anche in Turchia, Siria e Nord Africa. Gibbs fu l'ultimo a scrivere una monografia sul genere e riconobbe 72 specie; tuttavia, da allora sono descritte numerose nuove entità. La suddivisione in sottogeneri fu stabilita da Spach (1845) e successivamente modificata da Gibbs, che escluse diversi gruppi di specie, trasferendoli in altri generi correlati e riorganizzò gli altri in tre sottogeneri: *Genista* L., *Spartocarpus* Spach e *Phyllobotrys* Spach. La suddivisione è stata operata sulla base della morfologia delle foglie (semplici e trifoliate), sulle dimensioni e la forma dei peli, sulla disposizione dei rami (alternati, opposti, sub-opposti) e sulle caratteristiche del legume. Secondo Gibbs (1966) *Genista* sub. *Genista* è distribuito nella regione mediterranea, penisola Balcanica e Turchia; *Genista* sub. *Phyllobotrys* è maggiormente rappresentato nella zona occidentale della Penisola Iberica e nel Nord Africa; *Genista* sub. *Spartocarpus* è diffuso nella penisola Balcanica, ma ha anche un centro secondario nelle isole Baleari. Le varie specie di *Genista* (Gibbs, 1966; Talavera, 1999) sono di norma arbusti ramosi, inermi o spinescenti di diversa altezza (da camefite a nanofanerofite). La modalità di ramificazione è una caratteristica importante per distinguere i sottogeneri: è alterna in *Genista* e *Phyllobotrys*, opposta in *Spartocarpus*. È possibile discriminare due tipi principali di specie spinose: quelle con rami spinescenti e con spine ascellari. I peli corti e sericei possono andare a ricoprire tutta la pianta o solo determinati organi. Per quel che concerne le foglie, invece, le maggiori differenze sono da attribuire alla presenza di specie unifoliate e trifoliate; anche se il genere mostra una tendenza generale ad essere unifogliato, sono presenti specie trifoliate in tutti e tre i sottogeneri, anche se molto più frequenti nel sottogenere *Spartocarpus*.

La maggioranza delle specie presenta foglie sessili, poche specie mostrano foglie picciolate. I fiori, gialli, formano infiorescenze con racemi contratti o lassi,

ombrelle, cime terminali o distribuite su tutto il ramo. Il calice è tipicamente bilabiato, con labbro superiore ben distinto da quello inferiore, di morfologia e pelosità variabili. La forma e la posizione delle brattee e in particolare delle bratteole sono risultati caratteri costanti per ciascuna entità. La morfologia dei pezzi fiorali, vessillo, ali e carena è diversa nell'ambito del genere, altri caratteri differenziali sono dati dalla diversa saldatura dei filamenti. La produzione di frutti è elevata; tuttavia, molti semi vengono mangiati dagli insetti e una frazione degenera precocemente; quindi, solo una quota inferiore rispetto a quella iniziale riesce a germinare. La morfologia del legume è varia: ovoida, ovoida oblunga, lineare o lineare complessa, glabra o con indumenti meno intensi.

L'impollinazione è di tipo entomofilo aspecifico; la maggior parte delle piante apparentemente non produce nettare, poiché le specie sono adattate per lo più ad ambienti aridi (Galloni et al., 2007; Lopez et al., 1999). Per compensare la mancanza del nettare, queste piante, hanno aumentato la produzione del polline per indurre gli insetti a visitare i loro fiori e garantire la dispersione del polline.

La diffusione del polline avviene mediante tre meccanismi (Lopez et al., 1999):

- Meccanismo a valva: la colonna riproduttiva (androceo e gineceo) emerge improvvisamente dalla carena liberando una nuvola di polline che aderisce alle pareti ventrali del corpo dell'insetto. La colonna ritorna, poi, nella posizione in cui si trovava prima della pressione esercitata dall'insetto. Con questo meccanismo il fiore può essere visitato da più di un insetto.
- Meccanismo a pompa: il polline è rilasciato sopra la carena e poi spinto sull'apice dei filamenti staminali. I grani di polline sono estrusi in piccole quantità attraverso un poro apicale ogni volta che il fiore è visitato da un insetto, aderendo al suo addome. Anche in questo caso sono possibili più visite al fiore da parte degli insetti.
- Meccanismo esplosivo, che si distingue in due tipi: (1) specializzato, in cui l'insetto, premendo contro la carena, fa emergere improvvisamente dall'interno la colonna riproduttiva che così si attacca alla superficie dorsale dello stesso. Le parti del fiore non ritorneranno più nella posizione iniziale e quindi il fiore non può più essere visitato utilmente da altri insetti; (2) non specializzato, in cui l'insetto premendo contro le ali e la carena del fiore provoca una fuoriuscita della colonna riproduttiva; l'impollinazione, quindi, prosegue in maniera simile al meccanismo a

valva tranne per quel che concerne la posizione terminale dello stilo, che in questo caso resta all'esterno della carena. In altri casi la corolla è completamente spostata. Il polline aderisce alla superficie ventrale dell'insetto attraverso due modalità: notosternotribico, ossia durante l'impollinazione la porzione posteriore dell'insetto è raggiunta dal polline nototribico con funzione di impollinazione, mentre la zona ventrale è raggiunta da polline sternotribico con funzione nutritiva; o sternotribico, in cui durante l'impollinazione tutto il polline aderisce alla parte ventrale del corpo dell'insetto.

Il granulo pollinico di *Genista* è solitario, ha dimensioni medie di circa 20-55  $\mu\text{m}$ , è tricolpato o a volte tricolporato come evidenziato in Ghirardelli et al. (2006).

## 1.5 *Genista tinctoria* L.

Negli ultimi secoli sono state descritte numerose specie riconducibili a *Genista tinctoria* L., tra queste *G. anxantica* Ten., oggetto del presente studio.

*Genista tinctoria* presenta un'areale di distribuzione molto ampio comprendente gran parte dell'Europa fino all'Ucraina e la Turchia. In Italia, è ampiamente distribuita in tutta la penisola, fatta eccezione che per le isole; è diffusa allo stato spontaneo lungo i sentieri collinari, nei boschi e nei prati incolti. *Genista tinctoria* è anche conosciuta con l'appellativo di ginestra minore, ginestrella e baccellina (Pignatti, 1997, 2017) ed appartiene al sottogenere *Genista*, sezione *Genista* (Gibbs, 1966). La pianta è un piccolo arbusto perenne, eretto, deciduo, che in condizioni ottimali raggiunge i 2 m di altezza. Come nelle altre leguminose la radice è fittonante e dotata di tubercoli ove vivono i batteri azotofissatori.

I rami sono sottili, legnosi e di colore marrone alla base, mentre quelli apicali sono verdi, tutti sono privi di spine, semplici, ascendenti, solcati, con un'altezza che varia dai 30 agli 80 cm.

La specie è estremamente polimorfica per una grande quantità di caratteri, ad esempio la pelosità dei diversi organi (fusto, foglie, calice e legume) è molto variabile, si presentano forme da glabre a pelose con tutti i gradi intermedi, riconducibili a quattro sottospecie: *G. tinctoria* subsp. *tinctoria* (calice e vessillo lungo, con calice glabro); *G. tinctoria* subsp. *ovata* (Waldst & Kit) Arcang. (calice e vessillo lungo, con calice peloso); *G. tinctoria* subsp. *tenuifolia* (Loisel.) Pignatti (calice e vessillo breve, con fiori prostrati); e *G. tinctoria* subsp. *scariosa* (Viv.) Pignatti (calice e vessillo breve, con fiori eretti) (Pignatti, 1997, 2017).

Le foglie, disposte in modo alterno, hanno lamina da ovulato-oblunga a lanceolato-ellittica, sono intere, sessili, di colore verde scuro. I numerosi fiori, di colore giallo oro, sono riuniti in racemi apicali fogliosi; la corolla è formata da una carena di circa 1 cm e da un vessillo eretto, le ali e la carena sono divaricate all'antesi che avviene tra maggio e luglio. Il calice è gamosepalo, persistente con labbro supero bifido. L'impollinazione avviene grazie a diverse specie di insetti (appartenenti a Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera) (Adey, 1984; Davis et al., 2013; Stroh, 2015) con un meccanismo di rilascio del polline esplosivo (Galloni et al., 2007).

I frutti sono legumi deiscenti a più semi (ca. 15-25 mm), contenenti semi glabri subsferici marrone scuro (3-12 × 2-3 mm) con dormienza fisica e buona longevità

(Tausch et al., 2019). La dispersione dei semi può avvenire a breve e media distanza per la presenza sia di barocoria per mezzo di legumi deiscenti (Stroh, 2015) sia di mirmecoria per la presenza di elaiosomi (Pemberton & Irving, 1990).

*Genista tinctoria* si incontra comunemente nei prati e pascoli mesofili e in quelli umidi e acidofili, nei boschi cedui soleggiati, sotto le siepi e nelle brughiere, dal piano fino a 1800 m sul livello del mare. La condivisione dell'habitat con *G. germanica* L. e *G. januensis* Viv. provoca spesso identificazioni erranee, che possono essere evitate, nel primo caso, notando la presenza di spine e, nel secondo, distinguendo i fusti a sezione triangolare e foglie caratterizzate da margine ialino.

Per quel che concerne le proprietà e gli utilizzi, *G. tinctoria* è classificata come una specie officinale tossica, ricca di alcaloidi (anagrina, citisina, metilcitisina), flavonoidi e fitoestrogeni (Łuczkiwicz M. & Kokotkiewicz A, 2005). Viene, inoltre, descritta come un'erba amara, diuretica, purgativa, ematica, che agisce anche come debole stimolante cardiaco e vasocostrittore. Un tempo era impiegata per uso interno in caso di gotta, reumatismi e idropisia, per uso esterno contro fratture, sciatica e ascessi. Tutte le parti di *G. tinctoria* contengono glucosidi luteolinici che producono un colorante giallo, impiegato sin dall'epoca romana per tingere i tessuti (da qui l'epiteto specifico), per questo motivo essa fu ampiamente coltivata (Csedö et al., 1981). Inoltre, il colore ricavato veniva mescolato con quello ottenuto da *Isatis tinctoria* L. (Brassicaceae) per produrre il verde Kendal e il verde Lincoln (Csedö et al., 1981).

Lo stesso Gibbs (1966) evidenzia una variazione continua dei caratteri peculiari in *G. tinctoria*, quali portamento, indumento e dimensione fogliare. Spesso, nella stessa popolazione, convivono individui glabri e tomentosi, e altri con caratteri intermedi. L'elevato numero di polimorfismo ha indotto diversi studiosi a classificare con nomi differenti la stessa specie (Pignatti, 1997, 2017) e molti sono stati i nomi delle specie usati per la descrizione di entità italiane, come nel caso di *G. anxantica* o altre specie afferenti al complesso di *G. tinctoria* (per esempio, *G. campestris* Janka, *G. alpestris* Bertol., *G. hungarica* A.Kern., *G. depressa* Besser, *G. tenorei* G.Don).

Il numero di cromosomi più rappresentato è  $2n = 48$ , ma è stata riportata poliploidia con alcuni conteggi  $2n = 96$  (Martin et al., 2009). Poco si sa sul ciclo vitale di *G. tinctoria*, sebbene i taxa riferiti a *Genista* abbiano una longevità documentata di

circa 10-15 anni [es. *G. monspessulana* (L.) O.Bolós & Vigo; Waloff, 1968; Alvarez M. 1999, comunicazione personale in Alexander & D'Antonio, 2003]. Per quanto concerne la *G. anxantica*, degno di nota è che è stata descritta esclusivamente per la Valle d'Ansanto. Questa entità, ora nota alle persone del posto con il nome di ginestrella (Molinaro, 2017), fu raccolta per la prima volta, all'inizio dell'Ottocento dal giovane collaboratore di Michele Tenore, direttore dell'Orto Botanico di Napoli, Giovanni Gussone di Villamaina (Avellino) (Fig. 3). Egli era laureato in medicina, ma con l'occupazione principale dello studio botanico. Nacque non molto distante dalle Mefite, luogo in cui cresce rigogliosa questa particolare popolazione, e molto probabilmente ricordi d'infanzia portarono Gussone alla raccolta di questa entità alquanto peculiare.



**Figura 3:** Reperto storico di erbario di *Genista anxantica* Ten. appartenente alla collezione Tenore [T1-NAP (Valle d'Ansanto, legit G. Gussone)] depositata nel *Herbarium Neapolitanum* (NAP) dell'Orto Botanico di Napoli (Università degli Studi di Napoli Federico II. NAP).

Tenore la descrive nel suo trattato “Flora Napolitana” (1820) come *G. anxantica* dal nome della valle, con la seguente descrizione:

“**545. Ginestra di Ansanto.** *Da una ceppaia legnosa nascono molti fusti che compongono un bel cespuglio alto circa due piedi; i rami sono angolati, si spandono in giro e sono per la maggior parte diffusi e divaricati; le foglie sono ovato ellittiche, o perfettamente ovali, nella grandezza variano da un pollice a 8*

*linee in lunghezza; esse sono glabre venose quasi lucide e di color verde mirto; i fiori nascono in cima de' rami, disposti in grappoli lunghi circa un pollice e mezzo da 10 a 20 per ogni grappolo; i calici sono profondamente ciquefidi, e muniti di piccolissime bratee setacee, le corolle sono falcate con i petali bislungi quasi eguali e tutti allontanati tra loro; gli stami sono riuniti in un sol cilindro, i pistilli hanno uno stilo lunghissimo lineare glabro e curvo in cima; i legumi sono lunghi circa un pollice e mezzo, glabri alquanto falcati, e contengono da sei a dodici semi. Tutta la pianta è glabra. Luogo natale, ecc. Nasce nelle colline della valle di Ansanto presso Frigento nel Principato Ulteriore, celebre per le sue mofete, per le esalazioni solforose, e per le scaturigini di acque minerali; fiorisce in giugno; è perenne. Fu raccolta per la prima volta dal mio valorosissimo ed infaticabile allievo il sig. D. Giovanni Gussone” (Fig. 3).*

Nello stesso trattato, egli propose anche una descrizione di *G. tinctoria* come specie differente e sempre presente nei dintorni della Mefite. Attualmente, nell'area di studio della Valle d'Ansanto, gli individui di *G. tinctoria* delle Mefite mostrano caratteri morfologici chiaramente differenti dagli individui di *G. tinctoria* presenti nelle boscaglie circostanti. Gli individui dal habitus tipico provenienti dai margini del bosco presso le Mefite della Valle d'Ansanto sono arbusti eretti con foglie morbide lanceolate-ellittiche, con pelosità variabile. Gli individui di *G. tinctoria* della Mefite mostrano, invece, ramificazione ascendente o prostrata e foglie ovato-lanceolate, glabre e spesse.

**CAPITOLO 2**  
**STRUMENTI D' INDAGINE**

## 2.1 Il DNA plastidiale

Il genoma plastidiale (cpDNA) è largamente utilizzato nelle analisi di diversità genetica e negli studi filogenetici, in quanto è presente in un numero relativamente elevato di copie e generalmente risulta omogeneo all'interno di una specie. Il cpDNA si compone di un unico cromosoma circolare di DNA a doppio filamento compreso tra le 129 Kb e le 217 Kb (Downie & Palmer, 1992) ed è costituito tipicamente da quattro regioni: un'ampia regione di geni a singola copia (Large Single Copy, LSC), una piccola regione di geni a copia unica (Small Single Copy, SSC) e due copie di regioni ripetute invertite che separano le regioni a copia unica (Inverted Repeat, IR).

Il DNA plastidiale è ereditato in maniera uniparentale, attraverso il seme, nella maggior parte delle Angiosperme per linea materna; invece, nelle Gimnosperme è ereditato generalmente per linea paterna, attraverso il polline (Corriveau & Coleman, 1988; Birky, 1995). L'eredità materna del DNA plastidiale è stata verificata per molti gruppi appartenenti alla famiglia delle Fabaceae (Keys et al., 1995; Gauthier et al., 1997; Tallury et al., 2005). Sono noti anche casi di eredità biparentale come in alcune specie appartenenti alla famiglia delle Passifloraceae (Hansen et al., 2007). Il cpDNA presenta un tasso di mutazione di circa 3 volte superiore rispetto al DNA mitocondriale e pari alla metà del DNA nucleare (Wolfe et al., 1987); le sue mutazioni sono da imputare essenzialmente a sostituzioni nucleotidiche e riarrangiamenti quali inserzioni, delezioni e inversioni.

Inoltre, a differenza del DNA mitocondriale, il genoma plastidiale è molto più stabile, poiché gli eventi di riarrangiamento avvengono con minore frequenza e tali da non compromettere il suo utilizzo per analizzare l'evoluzione di specie o generi affini (Judd et al., 2019).

### 2.1.1 La regione $trnL^{(UAA)}$ - $trnF^{(GAA)}$

La regione  $trnL^{(UAA)}$ - $trnF^{(GAA)}$  del genoma plastidiale comprende i geni per l'RNA transfer,  $trnL^{(UAA)}$  e  $trnF^{(GAA)}$ , organizzati in tandem, separati da sequenze spaziatrici non codificanti. Tale regione è posizionata nella regione ampia a singola copia del genoma plastidiale, a circa 8 Kb a valle del  $rbcL$  e include l'introne  $trnL^{(UAA)}$  e lo spaziatore intergenico  $trnL^{(UAA)}$ - $trnF^{(GAA)}$ .

L'introne  $trnL^{(UAA)}$  è compreso tra due esoni che codificano il tRNA per la leucina del cpDNA. Tale introne viene definito di Gruppo I, ed è caratterizzato da una

elevata struttura di base conservata che codifica l'autosplicing del pre-tRNA (Palmer, 1985). Nelle piante, l'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> di solito mostra sequenze conservate nelle regioni fiancheggianti entrambi gli esoni del *trnL*<sup>(UAA)</sup>, mentre la parte centrale è altamente variabile (Bakker et al., 2000).

Lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> è situato nel tratto di DNA compreso tra il gene che codifica per l'RNA transfer (tRNA) della leucina e il gene che codifica per il tRNA della fenilalanina e ha una lunghezza di circa 400 bp.

La natura conservativa dei geni RNA transfer e l'apparente assenza di riarrangiamenti dei geni nella regione *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> ha facilitato il disegno di primer universali (Taberlet et al., 1991). Per tale ragione l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> sono considerati due dei marcatori plastidiali più ampiamente utilizzati in analisi filogenetiche delle piante (Quandt et al., 2004).

La raccolta di una grande quantità di sequenze della regione *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> da un ampio range di piante ha permesso ulteriori studi sulla sua struttura, funzione ed evoluzione (per esempio in differenti ordini di piante a fiore: Bakker et al., 2000; nelle angiosperme: Borsch et al., 2003; nelle piante terrestri: Quandt et al., 2004; nelle briofite: Quandt & Stech, 2004).

### **2.1.2 Lo spaziatore intergenico *petB*-*petD***

Lo spaziatore intergenico *petB*-*petD* risiede sull'operone *psbB*; quest'ultimo codifica per i geni associati al Fotosistema II *psbB* (apo-proteina della clorofilla *a*), *psbH* (fosfoproteina associata al Fotosistema II), e per i geni *petB* (citocromo *b6*) e *petD* (complesso del citocromo *b/f*). Fotosistema I e II, il complesso del citocromo *b/f* e l'ATP sintasi collaborano all'unisono per convertire l'energia luminosa in energia chimica (Westhoff & Herrmann, 1987).

La sequenza genica codificante per il citocromo *b6* (*petB*) e per il complesso citocromo *b/f* (*petD*) si riscontrano a valle delle sequenze codificanti per i geni *psbB* e *psbH*, rispettivamente, e sono divise da una regione spaziatrice lunga circa 750 bp (Westhoff & Herrmann, 1987). Tale regione intergenica è variabile, ma la stabilità della sequenza nucleotidica a monte e a valle, ha consentito il disegno di primer universali come riportato da Prince (2015).

## **2.2 Il DNA nucleare**

Il DNA nucleare delle piante, contrariamente al DNA plastidiale, è un genoma diploide che viene trasmesso seguendo una segregazione mendeliana ed è quindi soggetto a ricombinazione (Doležel et al., 2007).

Le dimensioni dei genomi nucleari delle piante sono molto variabili. Attualmente, grazie alle nuove tecnologie e i metodi bioinformatici si descrivono molto rapidamente le dimensioni di nuove piante, riconoscendo primati sempre più aggiornati.

La grande variabilità nelle dimensioni dei genomi delle piante può in qualche modo essere attribuita al DNA ripetuto e a genomi duplicati (poliploidia) (Judd et al., 2019). I genomi nucleari, infatti, oltre a contenere DNA a singola copia, possiedono anche DNA ripetuto, che consiste di gruppi o famiglie di sequenze ripetute simili, ma non necessariamente identiche. La sequenza e la lunghezza delle ripetizioni variano tra le famiglie ripetitive all'interno di una specie, la quale a sua volta può avere da 1000 fino a 40000 famiglie ripetitive.

In base alla sua organizzazione nel genoma, il DNA ripetuto può essere suddiviso in due classi: ripetuto disperso e ripetuto seriale.

La classe del DNA ripetuto disperso, composta da sequenze ripetitive che mostrano vari gradi di divergenza delle sequenze, comprende elementi trasponibili e retrotrasposoni, che sono sparsi lungo tutto il genoma. Le sequenze ripetute seriali vengono indicate come DNA satellite e sono sequenze non codificanti associate a strutture caratteristiche dei cromosomi come i centromeri e i telomeri. Di questa classe fanno parte i microsatelliti.

### **2.2.1 I microsatelliti (nrSSR)**

I microsatelliti sono tratti di DNA caratterizzati dalla ripetizione di due o tre nucleotidi ripetuti in gruppi sparsi su tutto il genoma (nel caso del DNA plastidiale di norma la ripetizione è di un unico nucleotide per cui la sua trattazione non è particolarmente agevole) che vanno da 3 a 100 volte.

L'utilizzo e lo studio di tali regioni sono stati trascurati per molto tempo dato che rientravano nelle regioni non codificanti del genoma, fino a quando non sono stati evidenziati ruoli regolativi.

A volte può accadere che l'enzima DNA polimerasi commetta degli errori durante la reazione di allungamento di questi tratti, a causa dell'alto tasso di ripetizioni su un breve tratto di DNA, non andando ad incorporare dei nucleotidi nella sequenza

e originando così, oltre al prodotto di amplificazione atteso, anche altri di minori dimensioni. Questo fenomeno prende il nome di slittamento o slippage della DNA polimerasi. Lo slittamento della replicazione avviene anche durante l'amplificazione mediante PCR di sequenze microsatellite in vitro. Per tale motivazione, una caratteristica delle amplificazioni microsatellitari è la presenza di bande stutter che differiscono in peso e dimensione dai prodotti principali amplificati (Shinde et al., 2003).

Le mutazioni occasionali della lunghezza del DNA del tratto microsatellitare sono attribuibili allo scivolamento dei due filamenti di DNA durante la fase di replicazione (slippage replicativo) e ad errori del sistema di riparazione delle basi del DNA.

Questi meccanismi sono in grado di creare l'inserzione o la delezione di uno o più elementi del motivo ripetuto con un tasso piuttosto alto ( $10^{-4}$  mutazioni per divisione cellulare) creando livelli alti di polimorfismo di lunghezza. Questa caratteristica è uno dei vantaggi di questi marcatori co-dominanti in studi di genetica di popolazione.

I marcatori microsatellitari sono marcatori co-dominanti, il che li rende un ottimo strumento per discriminare l'allele, nel caso di omozigosi, o gli alleli in caso di eterozigosi. I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo. Questi sono in grado di mettere in evidenza un'elevatissima diversità genetica, ma presentano alcune limitazioni nello studio della struttura e della ripartizione della variabilità genetica entro e tra popolazioni (Bruford & Wayne, 1993). È noto che l'uso dei microsatelliti può generare meccanismi sfavorevoli, quali l'omoplasia, una delle conseguenze dell'alta variabilità dei tassi mutazionali di questi marcatori molecolari. Per un marcatore genetico l'omoplasia si verifica quando, a causa di eventi mutazionali si hanno copie diverse di uno stesso locus di ugual lunghezza, non identiche per discendenza. L'omoplasia è implicita ai modelli mutazionali dei marcatori, tanto che è difficile pensare a due eventi evolutivi indipendenti (omoplasia e modelli mutazionali) e dipende anche da altri fattori evolutivi indipendenti dai modelli mutazionali, come l'effettiva dimensione della popolazione e il tempo di divergenza delle popolazioni stesse. I genetisti di popolazione hanno rivolto l'attenzione al tema omoplasia come conseguenza della popolarità dei loci microsatellitari come marcatori genetici (Estoup et al., 2004). Gli alleli microsatelliti generalmente

corrispondono a frammenti di DNA di lunghezza diversa evidenziabili attraverso metodi elettroforetici. Con i metodi elettroforetici, però, non è possibile evidenziare se due o più alleli che hanno la stessa lunghezza siano identici per discendenza. Per ovviare a questo problema bisogna sequenziare i singoli alleli attraverso tecniche di subclonaggio e poi eseguire un confronto delle sequenze tramite allineamento (Queney et al., 2001).

Un altro fattore che complica l'analisi microsatellitare è il tasso di mutazione. I tassi di mutazione variano considerevolmente tra i diversi taxa, sono state ben osservate sostanziali variazioni tra i loci e nei loci in relazione ai tassi di mutazione (Brinkmann et al., 1998; Crozier et al., 1999; Ellegren 2004; Gardner et al., 2000; Xu et al., 2000, Kalia et al., 2011). Quando i microsatelliti si presentano con dimensioni alleliche diverse (Garza et al., 1995) il loro tasso di mutazione in un dato locus non è sempre lo stesso e non è costante nel tempo; infatti, il tasso di mutazione e la direzione della mutazione sono influenzati dalla lunghezza dell'allele (Ellegren 2004; Xu et al., 2000).

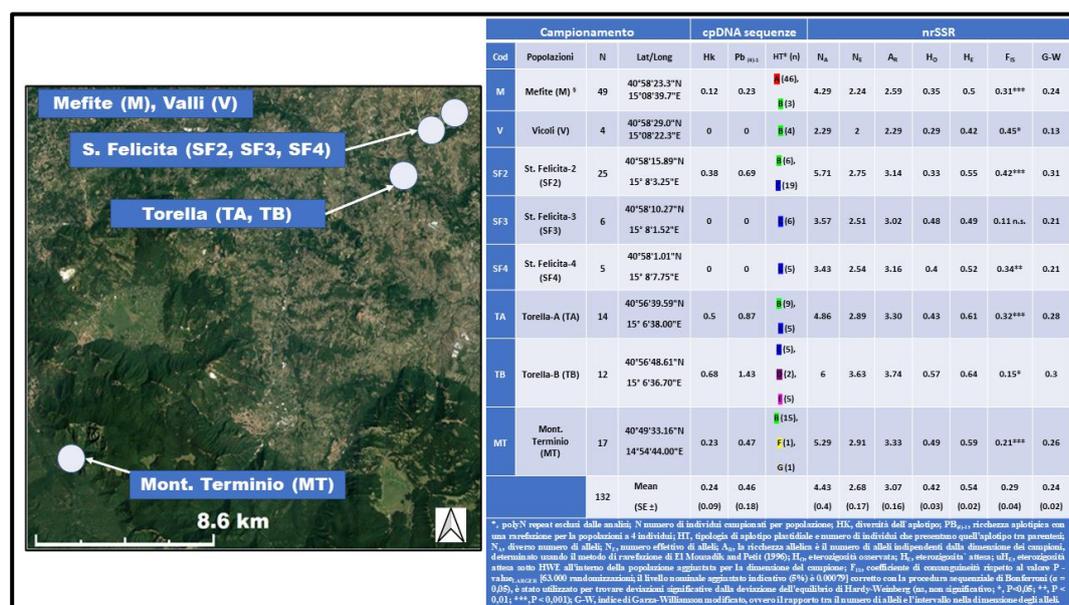
Negli ultimi anni, lo sviluppo delle nuove tecnologie (Next Generation Sequencing, NGS) ha permesso di identificare efficacemente un numero sostanzioso di loci microsatellitari con un risparmio di tempo, costi e lavoro (Taheri et al., 2018, Chen et al., 2018, Neophytou et al., 2018, McEwens et al., 2011).

Queste tecnologie hanno segnato una svolta rivoluzionaria nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni rispetto al metodo di sequenziamento del DNA di prima generazione (sequenziamento Sanger), grazie alla potenzialità di produrre, in un'unica seduta di analisi, una quantità di informazioni genetiche milioni di volte più grande.

**CAPITOLO 3**  
**MATERIALI E METODI**

### 3.1 Campionamento

Per la conduzione di questo studio, sono stati raccolti frammenti fogliari da 132 individui. I campioni sono stati raccolti dalla popolazione di *Genista tinctoria* delle Mefite e da sette popolazioni di *G. tinctoria*, di cui quattro limitrofe all'area delle Mefite (V, SF2, SF3, SF4) ed altre tre popolazioni geograficamente più distanti come mostrato in Figura 4. Per comodità di esposizione, la popolazione di *G. tinctoria* campionata presso le Mefite verrà chiamata *G. tinctoria* delle Mefite.



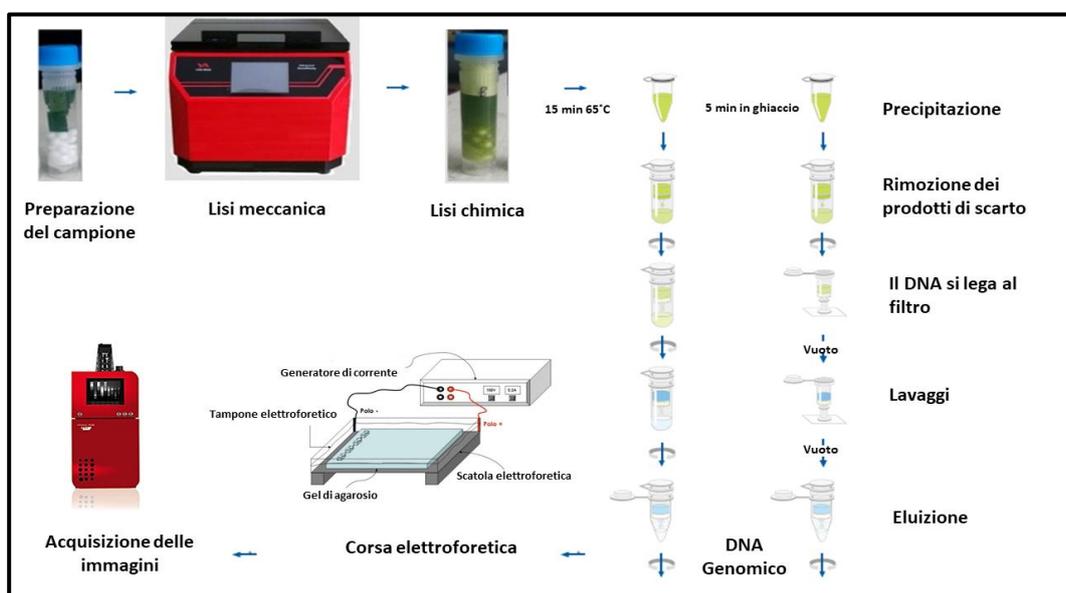
**Figura 4:** Popolazioni campionate per la conduzione del seguente studio (cerchio celeste). Le principali caratteristiche genetiche delle otto popolazioni di *Genista tinctoria* incluse nelle analisi genetiche di popolazione utilizzando tre sequenze plastidiali (cpDNA) e sette loci di microsatelliti nucleari (nrSSR) sono riportate nella tabella a destra. Per l'area delle Mefite della Valle d'Ansanto, i campioni di *Genista* descritti come *G. anxantica* da Tenore (1812) sono stati indicati nel testo come *G. tinctoria* delle Mefite.

La raccolta dei campioni è stata effettuata tra il 2016 ed il 2019. Fatta eccezione che per la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (Mefite; codice M), in cui gli individui presenti si distribuiscono su tutta l'area in ordine sparso, le altre popolazioni di *G. tinctoria* campionate sono molto raggruppate. Inoltre, alcune popolazioni sono relativamente vicine, come ad esempio SF2 e SF3 (S. Felicità), ma sono state considerate come due popolazioni diverse per le analisi (Fig. 4), perché non c'è continuità di individui. Dalla località delle Mefite sono stati raccolti 49 individui, coprendo così la maggior parte della distribuzione di questa popolazione (codice M, Fig. 4). A causa della difficoltà di campionamento nel sito, questi campioni sono stati considerati rappresentativi di tutti gli individui presenti all'interno dell'area interessata dalle emissioni di gas, così come documentato in Figura 6D. La dimensione complessiva della popolazione è stata stimata dal

censimento in ca. 115 individui, dopo un conteggio diretto degli esemplari di *G. tinctoria* delle Mefite. Il rinnovamento sembra assente nella parte alta dell'area, che corrisponde alla zona di emissione del gas, mentre, al contrario, nella parte mediana della valle, che corrisponde al Vado Mortale, si è registrato il massimo del rinnovamento sulle sponde del torrente Bagni. Sono stati effettuati diversi campionamenti in natura per trovare possibili individui di *G. tinctoria* nelle aree circostanti a quella delle Mefite, che non fossero soggetti a condizioni abiotiche estreme (Fig. 4). Queste spedizioni hanno consentito il campionamento di quattro piccole popolazioni di *G. tinctoria* ai margini e all'interno del bosco delle Mefite: una piccolissima popolazione di quattro campioni è stata rinvenuta a circa 400 metri a nord-ovest dell'area delle Mefite (località Vicoli, codice V, Fig. 4); sono state campionate tre popolazioni a sud rispetto alle popolazioni delle Mefite (località S. Felicità, Fig. 4), a partire da circa 600 metri di distanza dalle Mefite. Queste popolazioni (codici SF2, SF3, SF4; Fig. 4) sono poco distanti le une dalle altre e le ultime due sono costituite da pochi esemplari (25, 6 e 5 individui, rispettivamente). Inoltre, sono state campionate anche tre popolazioni di *G. tinctoria* più distanti dalla popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, ovvero a 3,5 e 4 km per le prime due popolazioni (località Torella; cod. TA, e cod. TB, Fig. 4) ed a circa 25 km è stata rilevata l'ultima popolazione di *G. tinctoria*, sul ciglio della strada confinante con il bosco (Mont. Terminio, cod. MT; Fig. 4).

### 3.2 Estrazione del DNA

Il DNA genomico totale è stato isolato da 25 mg di foglie fresche, dopo una lisi meccanica, è stata eseguita la lisi chimica, utilizzando il kit Exgene Plant SV (GeneAll Biotechnology), secondo le istruzioni fornite dal produttore (Fig. 5). Il DNA è stato risospeso in 80  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O Molecular Biology Grade e priva di nucleasi (Ambion, Thermo Fisher Scientific). La concentrazione di DNA è stata stimata confrontando 4  $\mu$ L di DNA estratto con uno standard di DNA (GeneRuler Express DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) su un gel di agarosio all'1% contenente SafeView Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials Inc, ABM) ed utilizzando UVIDOC HD5 (UVITEC), come sistema di visualizzazione, acquisizione e quantificazione delle corse (Fig. 5).



**Figura 5:** schema del protocollo di estrazione, visualizzazione e quantificazione del DNA genomico.

### 3.3 Sequenziamento: amplificazione e sequenziamento dei marcatori plastidiali

Dopo aver effettuato uno screening dei marcatori molecolari plastidiali più frequentemente utilizzati per questi studi, testando tre individui di ciascuna popolazione, sono stati individuati tre marcatori plastidiali variabili: l'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup>, gli spaziatori intergenici *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> e *petB-petD*. Gli spaziatori interni trascritti (*ITS1-2*) sono stati scartati dallo studio perché non sono risultati variabili tra gli individui delle popolazioni analizzate.

I marcatori plastidiali sono stati amplificati utilizzando sia primer riportati in letteratura, che progettati *ad hoc* per questo studio. L'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> sono stati amplificati con il primer c (forward, 5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') e il primer f (reverse, 5'-ATT TGA ATTO GGT GAC ACG AG-3') (Taberlet et al, 1991); lo spaziatore intergenico *petB-petD* è stato amplificato, invece, utilizzando due primer progettati *ad hoc* (forward: *GTpetB* 20F, 5'-GCA TTT TTC ATT TGG GGG AGG A-3'); (reverse: *GTpetD* 713R, 5'-TGC TCA ATA CCC AAG TAG GCT-3').

Le PCR sono state eseguite utilizzando:

- 10 ng di DNA genomico,
- 0,25  $\mu$ M di ciascun primer,
- Kodaq 2X PCR MasterMix (Applied Biological Materials, ABM).

È stata utilizzata una dnapolimerasi ad alta fedeltà Kodak 2X MasterMix, hot start, secondo le istruzioni del produttore, con una  $T_A$  di 55°C per tutti i marcatori.

I frammenti amplificati sono stati purificati utilizzando la precipitazione PEG-8000 (PEG 15%, NaCl 2,5 M) e sono stati sequenziati utilizzando coloranti fluorescenti (Bright Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ICloning). Le quantità di purificato stampo e primer da utilizzare nella reazione di sequenziamento sono state calcolate conformemente a quanto riportato nelle istruzioni del produttore. Le reazioni sono state purificate, utilizzando il kit di purificazione BigDye XTerminator (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), e lette utilizzando un sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software AB DNA Sequencing Analysis ver. 5.2 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), e le sequenze ottenute sono state editate, assemblate e allineate con il software Chromas Pro ver. 2.1.8. (Technelysium Pty Ltd). Dai dati di sequenza ottenuti, è stata

preparata una mappa per valutare la distribuzione, la frequenza e le caratteristiche degli aplotipi per le località campionate.

### 3.3.1 Analisi dei dati

Le relazioni genealogiche tra le otto popolazioni di *Genista* sono state esaminate costruendo una rete ed utilizzando il metodo della parsimonia (MP) di Templeton et al. (1992), implementato nel software TCS ver. 1.21 (Clement et al., 2000). Ogni inserzione/delezione (*indel*) è stata considerata come un singolo evento di mutazione e tutte le *indel* sono state, quindi, codificate come singole posizioni nell'allineamento finale. Le ripetizioni mononucleotidiche (*polyN*) nelle sequenze del cpDNA sono state escluse da questa analisi, in quanto possono produrre artefatti a causa della possibile omoplasia nelle sequenze di microsatelliti (Jarne & Lagoda, 1996; Goldstein & Pollock, 1997; Provan et al., 2001).

Il software TCS è stato eseguito con un limite di connessione di parsimonia del 95%. Per confermare la possibile specie ancestrale è stato inserito nel calcolo un *outgroup*. È stata selezionata *G. anglica* L. (Puntone Scirocco, Aspromonte, Calabria) [voucher, S. Giuria OPTIMA Iter 8th, s.n. (RNG)] come *outgroup*, considerando la filogenesi di *Genista* (Pardo et al., 2004; Rega, 2008) e fissando un limite di connessione a 89 passaggi.

La diversità aplotipica (hK) e la ricchezza aplotipica (Pb) dopo la rarefazione [r(n)] sono state stimate tra le popolazioni, tenendo conto delle differenze nella dimensione del campionamento, utilizzando il software RAREFAC (Petit et al., 1998). Un'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stata eseguita per suddividere la variazione genetica totale all'interno e tra i componenti delle popolazioni, utilizzando il software Arlequin ver. 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2005), includendo sia tutte le popolazioni sia escludendo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (cod. M). La significatività dell'AMOVA è stata valutata con un valore di 1000 permutazioni. Anche l'isolamento per distanza (IBD; Wright, 1943) è stato testato considerando sia l'inclusione delle otto località, che l'esclusione del sito delle Mefite (cod. M; *G. tinctoria* delle Mefite), attraverso la correlazione tra matrici di popolazione a coppie e valori di distanza genetica linearizzata [  $\frac{FST}{(1-FST)}$ ; Slatkin, 1995] e logaritmo naturale delle distanze geografiche calcolate tra le popolazioni (Rousset, 1997) da un test di Mantel (1000 permutazioni) utilizzando il software GenAlEx ver. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). La matrice della distanza genetica a

coppie è stata calcolata utilizzando Arlequin, con 10000 permutazioni e la matrice della distanza geografica è stata calcolata utilizzando GenAlEx.

La presenza di barriere genetiche al flusso dei semi tra i siti è stata studiata utilizzando l'algoritmo di differenza massima di Monmonier (1973) implementato nel software BARRIER ver. 2.2 (Manni et al., 2004). In breve, BARRIER viene utilizzato per identificare i confini tra una popolazione e l'altra, ovvero le aree in cui le differenze tra coppie di popolazioni sono maggiori (Manni et al., 2004).

Questo software analizza le associazioni tra le distanze genetiche e quelle geografiche, identificando dove possono essere presenti barriere genetiche tra le popolazioni analizzate. Le coordinate geografiche di ciascun sito di campionamento sono state collegate tra loro dalla triangolazione di Delaunay ed è stata derivata la corrispondente tassellazione di Voronoï. Una volta ottenuta la rete, ogni spigolo dei poligoni è stato associato alla sua distanza genetica a coppie. Una matrice di distanza a coppie ( $F_{ST}$ ) è stata utilizzata come misura della differenziazione genetica tra le popolazioni. Come impostazione iniziale, nelle analisi sono state applicate otto barriere, scegliendo alla fine soltanto quelle che coincidevano con valori  $F_{ST}$  significativi tra le popolazioni ( $P < 0,05$ ).

È importante notare che BARRIER, di norma, è utilizzato per una scala geografica più ampia in cui la posizione di campionamento può essere definita con un unico punto di coordinate (ad es. De Castro et al., 2020); in questo caso, a causa della piccola scala per alcune popolazioni di *Genista*, è stato utilizzato come coordinata geografica il centro di distribuzione delle popolazioni (es. Mefite, cod. M, *G. tinctoria* delle Mefite; e S. Felicita, codice SF2, *G. tinctoria*) (Fig. 6C). Lo stesso problema è stato riscontrato per la popolazione di *G. tinctoria* del Monte Terminio (codice MT), ma essendo più distante dalle altre popolazioni (cioè a scala maggiore) (Fig. 6C), la distorsione nel generare un poligono costruito da un'unica coordinata geografica per la popolazione campionata non è osservabile.

### **3.4 Genotipizzazione: amplificazione e sequenziamento delle regioni microsatellitari**

Per le analisi dei loci microsatellitari nucleari o Short Sequence Repeats (SSR) è stato effettuato uno screening, utilizzando due librerie di primer riportate in letteratura (Kleist et al., 2014; Peakall et al., 1998) per amplificare loci di SSR che siano discriminanti e ripetibili nelle popolazioni di *Genista* esaminate.

L'amplificazione PCR è stata condotta utilizzando il metodo PCR M13(-21)-tailed (Schuelke, 2000). Le PCR sono state eseguite in un volume totale di 10  $\mu$ L contenente 10 ng di DNA genomico, 0,04  $\mu$ M di primer M13(-21)-tail + forward, 0,16  $\mu$ M di primer reverse e di primer M13(-21)-tail (5' -TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') marcato con coloranti fluorescenti. Come per le amplificazioni riportate nel paragrafo 3.3, anche qui è stata utilizzata una dnapolimerasi ad alta fedeltà Kodak 2X MasterMix, hot start, secondo le istruzioni del produttore. La temperatura di annealing e il numero di cicli sono riportati in Tabella 1. Per alcuni loci, sono stati eseguiti ulteriori otto cicli finali, consistenti in: 30 s a 95 °C, 45 s a 53 °C e 45 s a 72 °C, seguiti da un passaggio finale di 10 min a 72°C come riportato in Schuelke (2000) (Tab. 1).

Per confermare la presenza di ripetizioni microsatellite, gli ampliconi sono stati subclonati e sequenziati secondo i metodi descritti per i marcatori di sequenza plastidiali. Successivamente, ca. 0,5  $\mu$ L del prodotto PCR sono stati aggiunti a 12  $\mu$ L di Hi-Di Formammide (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e 0,4  $\mu$ L di LIZ GeneTrace 500 Plus (CarolinaBioSystem) per la corsa al sequenziatore 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

**Tabella 1.** Informazioni sui dieci loci SSR selezionati nello studio.

Locus	Primer (5'-3') <sup>†</sup>	Ta	Cicli	Ref.	Locus	Primer (5'-3')	Ta	Cicli	Ref.
<b>Uc3</b>	F: TGTCTCTTAGTTGGGAAAGTC	55 °C	30 + 8*	1	<b>Uc29</b>	F: GGTGTGCCTCTATCTATTGCTA	55 °C	30 + 8*	1
	R: GCCATTTAAGAAAGGGGTTCA					R: ACGATGGAGGATCCAAACAG			
<b>Uc6<sup>§</sup></b>	F: CAGTGAATCACATCACAAAGA	65>55 °C (TD)	30 + 8*	1	<b>Uc36</b>	F: GTCATGCTGCGTTGTCAAGT	57 °C	34	1
	R: TCCACCACTACCCCTTCCTTC					R: AAAGCAGTTCCAAAATCACAAA			
<b>Uc7</b>	F: AAGAGCATCTTGTGGCGTTT	57 °C	28	1	<b>Uc38<sup>§</sup></b>	F: GCTTCAGAAGATGGCATTG	55 °C	30 + 8*	1
	R: TTACCCGCCTTGAATGCTAC					R: AAAGCTTACTGGACACAAGATTCA			
<b>Uc24</b>	F: GGGAGACAGAGACACAGGGAAT	59 °C	30 + 8*	1	<b>Uc39</b>	F: ATAACGTTTCATGGGGTGCT	57 °C	30 + 8*	1
	R** <sup>§</sup> : CGTTAGCGCGTACCGAATC			t.s.**		R: TTGGTAGAAGGGAGCCAGTG			
<b>Uc26<sup>§</sup></b>	F: AGGTCCAAACCCGAAAAACT	60>58 °C (TD)	30 + 8*	1	<b>AG81</b>	F: ATTTTCCAACCTCGAATTGACC	55 °C	30 + 8*	2
	R: CCTGCTCCTTATGCACCTTC					R: TCATCAATCTCGACAAAAGAATG			

<sup>†</sup>, forward primer con M13(21) -tail 18 mer (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'); \*, cicli aggiuntivi come riportato in Schuelke (2000); **TD**, touch-down PCR; **1**, Kleist et al., 2014; **2**, Peakall et al., 1998;

\*\*<sup>§</sup>, primer utilizzati nella reazione di amplificazione; d.s., in questo studio; <sup>§</sup>, loci esclusi dall'analisi statistica.

### 3.4.1 Analisi dei dati

Le dimensioni degli alleli e l'unità di fluorescenza relativa (RFU) sono state determinate utilizzando i software Peak Scanner ver. 1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e GelQuest ver. 3.5 (SequentiX - Digital DNA Processing). È stata eseguita anche un'attenta valutazione manuale dei pattern elettroforetici, come raccomandato in DeWoody et al. (2006).

Circa il 5% dei campioni, scelto in maniera casuale, è stato riamplicato in una reazione separata per garantire l'accuratezza del punteggio dimensionale e i campioni senza ampliconi sono stati amplificati tre volte per confermare il pattern elettroforetico. In ciascuna piastra sono stati utilizzati quattro campioni come standard di riferimento per garantire il corretto dimensionamento degli alleli.

È stato utilizzato il software MICROCHECKER ver. 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) come controllo aggiuntivo per correggere potenziali errori di conteggio causati dall'esistenza di stuttering e/o dropout (balbuzia ed efficienza di amplificazione inferiore negli alleli grandi a differenza degli alleli piccoli, rispettivamente).

La frequenza indiretta di alleli nulli [che causa alcuni risultati errati secondo Dabrowski et al. (2014, 2015)] è stata stimata utilizzando ML-NULLFREQ (Kalinowski & Taper, 2006). Questo metodo stima la massima verosimiglianza (Maximum Likelihood, ML) della frequenza degli alleli nulli in un campione con o senza dati mancanti; inoltre, si è dimostrato come l'unico metodo in grado di fornire le migliori prestazioni di calcolo per evitare errori nei risultati elaborati (Dabrowski et al., 2015).

Inoltre, è stato impiegato l'algoritmo Expectation Maximization (EM) (Dempster et al., 1977) implementato nel software FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007) come metodo aggiuntivo di stima per gli alleli nulli; questo fornisce prestazioni migliori rispetto alle stime di Brookfield (1996) e Chakraborty et al. (1997) (Chapuis & Estoup, 2007). Gli effetti degli alleli nulli sono stati considerati quando la loro frequenza è risultata maggiore di 0,2 come suggerito da Dakin & Avise (2004) e Chapuis & Estoup (2007).

Per ogni locus microsatellitare è stato valutato il polimorfismo genetico, calcolando il contenuto di informazioni polimorfiche (PIC), attraverso il software Cervus ver. 3.0.7 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007); mentre per mezzo del software GenAlEx ver. 6.503 (Peakall & Smouse, 2012) sono stati calcolati il numero

effettivo di alleli osservati ( $A_T$ ), l'eterozigotità osservata e attesa ( $H_O$  e  $H_E$ ) e l'estimatore di Jost dell'indice di differenziazione allelica ( $D_{est}$ ). Le statistiche  $F$  ( $F_{IS}$ ) sono state calcolate utilizzando Arlequin e l'indice di  $F_{ST}$  è stato stimato correggendo la possibile presenza di alleli nulli attraverso l'utilizzo del software FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007), applicando 1.000 bootstrap per calcolare gli intervalli di confidenza del 95%.

La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) e il linkage disequilibrium (LD) tra i microsatelliti sono stati testati utilizzando GENEPOP ver. 4.1 (Rousset, 2008) e GeneAIEx.

I livelli di significatività sono stati aggiustati utilizzando la correzione Holm Bonferroni (Holm 1979) per confronti multipli con un livello iniziale di 0,05 (Rice 1989) utilizzando la correzione sequenziale Holm-Bonferroni attraverso l'applicazione di Gaetano (2018).

Utilizzando GenAIEx sono stati stimati, per ciascuna popolazione, il numero di alleli diversi ed effettivi ( $N_A$  e  $N_E$ ) e la media osservata e l'eterozigosi attesa ( $H_O$  e  $H_E$ ). Anche la ricchezza allelica ( $A_R$ ) è stata calcolata per ciascuna popolazione utilizzando il metodo di rarefazione, per mezzo del software FSTAT ver. 2.9.4 (Goudet, 2003), in cui tutte le popolazioni vengono confrontate alla dimensione della più piccola popolazione campionata (in questo sistema di studio è rappresentata dalla popolazione V con quattro esemplari, Fig. 4).

Attraverso l'utilizzo di questo ultimo software, è stato calcolato il coefficiente di consanguineità ( $F_{IS}$ ); la proporzione di 20000 randomizzazioni ha fornito un valore di  $F_{IS}$  ( $PROP_{LARGER}$ ) maggiore di quello osservato, ed è stato utilizzato per trovare deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg dopo la correzione sequenziale di Holm-Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ).

I dettagli del test AMOVA, le analisi di isolamento per distanza (IBD) e la posizione geografica delle discontinuità genetiche tra le popolazioni (cioè le barriere genetiche) sono stati calcolati come riportato nel paragrafo "4.2.1 Diversità genetica e struttura della popolazione". La differenziazione genetica a coppie ( $F_{ST}$ ) è stata stimata con il software FreeNA, corretto per gli alleli nulli.

Per stimare la struttura genotipica delle popolazioni in studio, il set di dati è stato analizzato mediante metodi di clustering basati su modelli bayesiani utilizzando il software STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Evanno et al., 2005). Sono state effettuate simulazioni preliminari per valutare i valori di replicati K, la

distribuzione delle frequenze alleliche ( $\lambda$ ; Evanno et al., 2005), il parametro di Dirichlet ( $\alpha$ ; Hubisz et al., 2009) e il parametro a posteriori sull'informatività dei dati di localizzazione del campionamento ( $r$ ; Hubisz et al., 2009).

Successivamente, il software è stato eseguito utilizzando sia un modello “admixture” fornendo informazioni sulle localizzazioni dei vari individui delle popolazioni (cioè LOCPRIOR), sia assumendo un modello di frequenze alleliche correlate, con 10 repliche indipendenti per un valore di  $K$  compreso tra 1 e 4 (numero di cluster genetici).

Ciascuna esecuzione è stata condotta con un periodo di masterizzazione di 100.000 iterazioni e una durata della simulazione post-masterizzazione di 200.000 iterazioni. La stessa analisi è stata eseguita anche senza LOCPRIOR, per valutare la coerenza dei risultati senza le informazioni sulla posizione del campionamento.

I risultati delle simulazioni ottenute sono stati utilizzati come input per il software online STRUCTURE HARVESTER ver. 0.6.94 (Earl & von Holdt, 2012), che verifica la coerenza delle simulazioni tra i diversi replicati ed identifica il raggruppamento di pool genetici idonei ( $K$ ) che meglio si adatta ai dati (Evanno et al., 2005).

I file di output generati sono stati, poi, analizzati con il software CLUMPP ver. 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) per il calcolo della similarità a coppie media ( $H'$ ), che definisce il miglior raggruppamento tra i delta  $K$  di valore assimilabile. Il software online STRUCTURE PLOT ver. 2 (Ramasamy et al., 2014) è stato utilizzato per visualizzare la struttura genotipica tramite istogrammi e per visualizzare i coefficienti di appartenenza al cluster ( $Q$ ) per ciascun campione. Gli individui sono stati assegnati ad un cluster se il loro coefficiente  $Q$  è superiore al 70% (soglia  $\geq 0,7$ ).

La dimensione effettiva della popolazione ( $N_e$ ) è stata stimata dai dati genetici, utilizzando il metodo del linkage disequilibrium, implementato nel software NeEstimator ver. 2.1 (Do et al., 2014), anche se il nostro dataset è costituito da sette loci. In effetti, questo approccio è più preciso e affidabile per set di dati microsatelliti che presentano 10-20 loci, una dimensione del campione di popolazione di ca. 50, e  $N_e < ca. 200$  (Waples & Do, 2010). Per evitare distorsioni nella stima di  $N_e$ , i valori soglia per i quali gli alleli non sono considerati, sono stati fissati a 0,02. Sono stati ottenuti intervalli di confidenza del 95% utilizzando la procedura parametrica per le popolazioni con  $n > 10$  campioni.

La recente riduzione della dimensione effettiva della popolazione è stata valutata utilizzando il software BOTTLENECK ver. 1.2.02 (Piry et al., 1999), che utilizza il test dell'eccesso di eterozigosi (H) basato sui metodi di Cornuet & Luikart (1996). Sono state analizzate solo le popolazioni costituite da un minimo di dieci individui (cioè codici M, SF2, TA, TB e MT; Fig. 4), come suggerito dal manuale del software. In breve, nelle popolazioni che hanno sperimentato recenti riduzioni della dimensione effettiva della popolazione, i numeri degli alleli si riducono più velocemente della diversità genetica. In una popolazione che ha subito un collo di bottiglia recente, l'eterozigosi osservata sarà significativamente maggiore dell'eterozigosi attesa in base al numero di alleli e alla dimensione del campione.

Usando questo metodo, il collo di bottiglia può essere rilevato fino a due e quattro generazioni di  $N_e$  (dimensione effettiva della popolazione) dopo l'evento (Cornuet & Luikart, 1996). È stato scelto un test del segno di Wilcoxon per valutare deviazioni significative dalla stazionarietà tra  $H_O$  e  $H_E$ , implementandolo con 10.000 repliche in un modello a due fasi (Two-Phase Model, TPM; Di Rienzo et al., 1994), in cui la proporzione del modello di mutazione graduale (Stepwise Mutation Model, SMM) nel TPM è del 90% e la varianza del 10% (mutazione a più passaggi). Inoltre, è stata eseguita un'analisi comparativa con il modello IAM (Infinite Allele Model, Kimura & Crow, 1964) e SMM. La probabilità di un eccesso di eterozigosi è stata determinata utilizzando un test di Wilcoxon a una coda.

Infine, per rilevare una riduzione più antica della dimensione effettiva della popolazione ( $> 100$  generazioni), è stato effettuato il calcolo dell'indice di Garza-Williamson modificato (G-W) o chiamato anche test del rapporto M (Garza & Williamson, 2001) mediante Arlequin.

Il G-W è il rapporto di  $\frac{k}{(R+1)}$ , dove  $k$  è il numero di alleli in un dato locus in un campione di popolazione e  $R$  è l'intervallo allelico (Excoffier et al., 2005). Originariamente nel rapporto M, il denominatore era definito solo da  $R$ , ma questo potrebbe portare ad una divisione per zero se un campione risulta monomorfo (Garza & Williamson, 2001), per cui all'equazione è stato aggiunto il +1. Questo indice ha dimostrato di essere sensibile alle dimensioni della riduzione della popolazione passata, perché quando una popolazione soffre di un collo di bottiglia, gli alleli rari tendono ad essere persi a causa del fenomeno di deriva genetica. La perdita di un qualsiasi allele contribuirà alla riduzione di  $k$ , ma solo la perdita dell'allele più grande o più piccolo contribuirà alla riduzione di  $R$ , per cui  $k$  si

ridurrebbe più rapidamente di R. Il rapporto risulta essere molto piccolo, quindi, in popolazioni che hanno avuto una riduzione della dimensione ( $< 0,68$ ) e vicina ad 1 nelle popolazioni stazionarie ( $> 80$ ) (Garza & Williamson, 2001).

### 3.5 Il flusso genico: polline vs seme

Il rapporto di migrazione polline-seme è stato stimato utilizzando l'equazione di Petit (1992) e Ennos (1994):  $r = \frac{m_p}{m_s}$  (dove  $m_p$  e  $m_s$  sono i valori di migrazione per

polline e semi) che corrispondono a  $\frac{\left(\frac{1}{G_{STb}} - 1\right)(1 + F_{IS}) - 2\left(\frac{1}{G_{STm}} - 1\right)}{\left(\frac{1}{G_{STm}} - 1\right)}$ , dove  $G_{STb}$  e  $G_{STm}$

rappresentano il livello di differenziazione genetica della popolazione basato sui marcatori nucleari biparentali e quelli plastidiali uniparentali, mentre  $F_{IS}$  corrisponde al deficit di eterozigoti stimato con i marcatori codominanti nucleari. Gli indici di differenziazione genetica sono stati stimati utilizzando Arlequin e il coefficiente di consanguineità ( $F_{IS}$ ) utilizzando il software FSTAT.

Valori maggiori di  $r$  indicano che il flusso genico per il polline è quantitativamente più consistente del flusso genico attraverso i semi. Il calcolo del rapporto flusso polline/seme presentato qui presuppone che l'ereditarietà del DNA plastidiale sia di origine materna in *G. tinctoria*, come nella maggior parte dei taxa di Leguminosae (Corriveau & Coleman, 1988; Zhang et al., 2003).

**CAPITOLO 4**  
**RISULTATI**

## 4.1 Analisi del DNA plastidiale

Tra i tre marcatori plastidiali utilizzati, lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> ha mostrato la maggiore variabilità genotipica (tre SNP ed un polyA) rispetto allo spaziatore intergenico *petB-petD* (due SNP ed una indel) e il *trnL*<sup>(UAA)</sup> (una indel ed un polyA).

Le ripetizioni polinucleotidiche sono state escluse dalle analisi genealogiche (come riportato in Materiali e Metodi); queste sono riscontrate nello spaziatore del *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> [polyA (8-11)] e nell'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> [polyA(8-12)] (Fig. 4). I polyAn presenti nell'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> sono diagnostici a livello di popolazione, essendo fissati nei campioni della popolazione di *Genista tinctoria* delle Mefite (A8), ad eccezione di tre individui più periferici che presentano un'adenina in più (A9). Il polyA9 è fissato anche in popolazioni vicine di *G. tinctoria* (codici V, SF2, SF3 e SF4; Fig. 6) e in una delle popolazioni più distanti di Torella (codice TA; Fig. 6). In altre due popolazioni distanti (*G. tinctoria*) si sono evidenziati pattern con un range A (8-9) in una delle due popolazioni di Torella (codice TB; Fig. 6) e A (9-10) nei campioni del Terminio (codice MT; Fig. 6). Il polyAn presente nell'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> è variabile solo in queste due popolazioni di *G. tinctoria*, cioè nei campioni di TB (A8, 10-11) e nella popolazione MT (A8, 10-12), che corrispondono ad una delle località di Torella ed al Monte Terminio (Fig. 6). Come già riportato, inoltre, le sequenze ITS sono state scartate dopo aver analizzato tre campioni per ciascuna popolazione a causa di un'identità del 100% tra i taxa in studio, ovvero non è stato rilevato alcun polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) tra gli individui di *Genista* in studio. Le analisi BLAST e di inferenza filogenetica condotte con il software MrBayes ver. 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) hanno confermato lo stato tassonomico delle accessioni di *Genista* riferite a *G. tinctoria*, il che conferma questa specie come un complesso monofiletico e polimorfico (dato non mostrato).

### 4.1.1 Relazioni tra aplotipi

Nei campioni di *Genista* sono stati individuati sette aplotipi plastidiali (Fig. 4); le relazioni genealogiche e una mappa geografica per valutare la distribuzione e la frequenza sono mostrate in Figura 6B, dove tre aplotipi (A-rosso, B-verde e C-blu) sono i più abbondanti (frequenze rispettivamente pari a: 34,8, 28 e 30,3%). L'aplotipo A-rosso è esclusivo dei campioni di *G. tinctoria* delle Mefite, fatta

eccezione che per altri tre individui periferici che presentano gli aplotipi B-verde (Fig. 6D). Questo aplotipo è presente in tutte le popolazioni di *G. tinctoria* in studio, fatta eccezione di una delle due popolazioni della località di Torella (codice TB) e di due località di S. Felicità (codice SF3-4). L'aplotipo C-blu è stato osservato in tutte le popolazioni, tranne che in *G. tinctoria* delle Mefite (codice M) e nelle due popolazioni di *G. tinctoria* di Vicoli (codice V) e Monte Terminio (codice MT). Nella popolazione di Torella (codice TB; *G. tinctoria*) sono stati rilevati due aplotipi (E-rosa e D-viola) a bassa frequenza (3,8 e 1,5%). Infine, nella popolazione del Terminio sono stati osservati due aplotipi rari (F-giallo e G-grigio) (codice MT; *G. tinctoria*) con una frequenza dello 0,8%. Questa popolazione, insieme a Torella (codice TB; *G. tinctoria*), presenta la maggiore variabilità aplotipica (tre aplotipi diversi in ciascuna).

Utilizzando *G. anglica* come outgroup, possiamo valutare che l'aplotipo A-rosso di Mefite deriva dal B-verde; quest'ultimo è presente anche in tre campioni periferici dell'areale di *G. tinctoria* delle Mefite, inoltre non vi è la presenza di un aplotipo intermedio. Nessun aplotipo rilevato in questo studio deriva da A-rosso, che è diagnostico per la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (Fig. 6A-B).

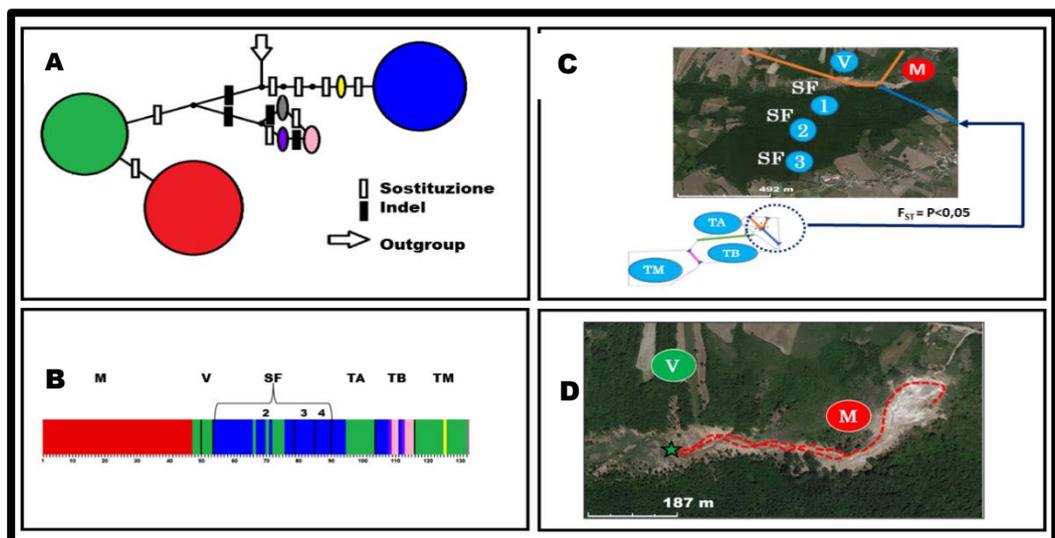
#### **4.1.2 Diversità genetica e struttura della popolazione**

La diversità aplotipica per ciascuna popolazione ( $H_k$ ) varia da 0, nelle popolazioni di Vicoli e S. Felicità di *G. tinctoria* (codici V e SF3-4), a 0,68 ( $\pm 0,08$ ) nella popolazione di Torella afferibile a *G. tinctoria* (codice TB).

La ricchezza aplotipica ( $Pb_{4-1}$ ) dopo rarefazione varia da 0 in Vicoli e in due popolazioni di S. Felicità (codici V e SF3-4; *G. tinctoria*), a 0,23 nella popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite a causa della presenza di un altro aplotipo (B-verde) nei tre campioni periferici, fino ad un massimo di 1,43 nella popolazione di Torella (codice TB; *G. tinctoria*), come mostrato in Figura 4.

Sono stati osservati risultati discordanti nelle analisi AMOVA considerando (1) tutte le popolazioni o (2) escludendo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (codice M), ovvero: (1) il test AMOVA assegna il 67,38% della variazione aplotipica alle differenze tra le popolazioni e il 32,62% alla differenza tra gli individui all'interno delle popolazioni ( $F_{ST} = 0,67$ ,  $P < 0,001$ ); (2) la variazione plastidiale nelle popolazioni di *G. tinctoria* è stata spiegata come il 47% dovuta alle differenze tra le popolazioni e il 53% all'interno delle popolazioni ( $F_{ST} = 0,47$ ,  $P < 0,001$ ).

Sono stati eseguiti Mantel test su matrici di distanza geografica e genetica, tra tutti i siti, e questi non hanno rilevato alcun isolamento per distanza ( $r = -0,14$  con  $P = 0,48$ ); al contrario, escludendo la popolazione di *G tinctoria* delle Mefite, è stata evidenziata una correlazione significativa di segno positivo tra le matrici delle distanze, indicanti un pattern di IBD ( $r = 0,56$  con  $P < 0,01$ ). Il dataset è stato sottoposto all'analisi per mezzo dell'algoritmo di Monmonier, implementato nel software BARRIER. Utilizzando tale software è importante notare un limite intrinseco dell'algoritmo nelle costruzioni poligonali (tassellazione del Voronoï), causato dalla piccola scala spaziale tra alcuni dei nostri campioni come, ad esempio, la popolazione delle Mefite (codice M; *G tinctoria* delle Mefite) che ha un range molto ampio e non può essere definito come un unico punto di coordinate (Fig. 6D). Per alcune delle popolazioni campionate, il software ha mostrato brusche interruzioni nella differenziazione genetica (cioè barriere genetiche, Fig.6C) di cui quattro barriere hanno mostrato un  $F_{ST}$  significativo ( $P < 0,05$ ).



**Figura 6:** (A) schema che mostra le relazioni tra gli aplotipi di cpDNA rilevati nelle popolazioni di *Genista* in studio, utilizzando *G. anglica* come outgroup. La dimensione della forma è proporzionale alla frequenza di ciascun aplotipo nel campionamento totale. Ogni linea nella rete rappresenta un passaggio mutazionale. I cerchi neri rappresentano aplotipi mancanti che non sono stati osservati nei dati; i rettangoli bianchi e neri rappresentano rispettivamente la sostituzione e le indel. Gli ovali colorati sono corrispondenti agli aplotipi, come mostrato nella Figura 4; (B) distribuzione degli aplotipi di cpDNA per ciascuna popolazione di *Genista* dedotta dal sequenziamento dei marcatori; ogni barra corrisponde ad un individuo analizzato; (C) mappa di distribuzione delle popolazioni di *G tinctoria* delle Mefite (codice M) e di *G. tinctoria*. La linea rosa rappresenta la posizione della barriera significativa ( $F_{ST} < 0,05$ ), ottenuta utilizzando l'algoritmo di differenza massima di Monmonier, tra la popolazione del Monte Terminio e tutte le restanti popolazioni in esame; quella verde divide le due popolazioni di Torella. Le barriere arancione e blu dividono la popolazione di *G tinctoria* delle Mefite da quelle di *G. tinctoria* più prossime alla zona delle Mefite. La barriera arancione, inoltre, divide la popolazione V di *G. tinctoria* dalle altre popolazioni dello stesso tipo prossime, oltre che dalla popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite; (D) distribuzione e aplotipi di cpDNA di campioni raccolti di *Genista* dell'area delle Mefite (*G. tinctoria* delle Mefite, codice M).

La popolazione di Mefite (codice M; *G. tinctoria* delle Mefite) è divisa dalle popolazioni confinanti di *G. tinctoria* (codice V e SF2-4) da due barriere che si uniscono (linee arancioni e blu, Fig. 6C). La prima barriera (arancione), formata dall'unione di due segmenti, divide la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite dalle popolazioni limitrofe di S. Felicità (codici SF2-4; *G. tinctoria*) e la seconda barriera (blu) divide la prima popolazione dall'altra popolazione vicina di Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) (Fig. 6C). Per le altre popolazioni di *G. tinctoria* sono state osservate due barriere moderate (rosa e verde): una localizzata tra la popolazione di Monte Terminio (MT) e tutte le altre popolazioni in esame e l'altra tra le due popolazioni di Torella (TA e TB) (Fig. 6C).

## 4.2 Analisi dei microsatelliti

Sono state testate due librerie di loci microsatellitari: una composta da 12 loci disegnati su *G. monspessulana* (Kleist et al., 2014) ed un'altra composta da 31 loci disegnata per i generi appartenenti alle *Fabaceae* (Peakall et al., 1998). Dopo uno screening dei 43 loci su tre individui per ciascuna popolazione, sono stati scelti dieci loci (Tabella 2) e genotipizzati per le otto popolazioni in esame, per un totale complessivo di 132 individui. Dopo l'analisi dei dati grezzi, il locus UC6 si è rivelato monomorfo e i loci UC24, UC26 ed UC38 hanno presentato una bassa efficienza di amplificazione e la presenza di alleli nulli. Il locus UC24 è stato "resuscitato" a seguito del disegno di primer reverse progettati ad hoc (Tabella 1), mentre tre loci (UC6, UC26 e UC38) sono stati scartati dalle analisi. Nei sette loci restanti non è stata osservata alcuna evidenza di balbuzie o alleli nullo, dopo aver ottimizzato le amplificazioni (Tabella 1).

Le analisi delle frequenze alleliche nulle (NAF) con approccio ML hanno mostrato una media di 0,12 (SE  $\pm$  0,02) tra le popolazioni, con un intervallo di 2-7 loci per sito di raccolta (PNA in Tabella 2). L'intervallo di NAF risulta compreso tra 0,01 e 0,19, con soli due loci che presentano una moderata frequenza di alleli nulli pari a 0,19 (locus AG81) e 0,17 (locus UC24); i restanti loci hanno mostrato una frequenza da bassa a moderata, compresa tra 0,01 e 0,16 (Tabella 2). Non è stata osservata alcuna deviazione dell'equilibrio di HWE dei loci con alleli nulli. I risultati di FreeNa (algoritmo ME) sono simili a quelli ottenuti utilizzando il metodo ML, mostrando un NAF leggermente inferiore, con una media di 0,1 (SE  $\pm$  0,02) (Tabella 2). Nel calcolo del valore  $F_{ST}$  globale, non è stata osservata alcuna variazione significativa operando il calcolo senza e con correzione per alleli nulli (rispettivamente  $F_{ST} = 0,104943$  e  $0,099993$ ), i valori  $F_{ST}$  hanno mostrato un IC superiore al 95% (non utilizzando ENA il  $F_{ST} = 0,0686 - 0,1397$ ; utilizzando ENA  $0,07 - 0,1313$ ). Questi risultati indicano che l'impatto degli alleli nulli può essere trascurabile; ciò è confermato anche dalla simulazione eseguita da Chapuis & Estoup (2007), in cui gli autori sottolineano che gli alleli nulli hanno un effetto minore sulle stime della differenziazione della popolazione se  $NAF < 0,2$ .

**Tabella 2:** Parametri genetici per ciascuno dei sette loci microsatellitari nucleari utilizzati nelle otto popolazioni in studio.

<b>Locus</b>	<b>Repeat*</b>	<b>Lunghezze alleliche<sup>§</sup></b>	<b>P<sub>NA</sub></b>	<b>NAF<sub>-ML</sub></b>	<b>NAF<sub>-ME</sub></b>	<b>A<sub>T</sub></b>	<b>PIC</b>	<b>H<sub>O</sub></b>	<b>H<sub>E</sub></b>	<b>Dest</b>	<b>F<sub>ST</sub></b>	<b>F<sub>ST-ENA</sub></b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>HWE</b>
UC3	(GA) <sub>6</sub>	302-310	6	0,16	0,14	6	0,63	0,31	0,51	0,36	0,15	0,14	0,5	**
UC7	(TC) <sub>11</sub>	92-102	3	0,09	0,02	7	0,33	0,27	0,26	0,04	0,1	0,1	-0,005	n.s.
UC24	(AG) <sub>6</sub>	118-142	6	0,17	0,17	13	0,46	0,21	0,47	0,17	0,18	0,17	0,47	**
UC29	(GA) <sub>15</sub>	130-134	5	0,11	0,1	4	0,53	0,46	0,57	-0,003	0,02	0,03	0,30	**
UC36	(TC) <sub>15</sub>	176-230	6	0,12	0,12	16	0,74	0,49	0,67	0,21	0,07	0,07	0,25	**
UC39	(CT) <sub>11</sub>	227-245	2	0,01	0,01	17	0,83	0,88	0,78	0,33	0,09	0,09	-0,006	n.s.
AG81	(AG) <sub>4</sub>	129-135	7	0,19	0,17	10	0,57	0,29	0,53	0,09	0,13	0,129	0,61	**
<b>Media</b>				0,12	0,1	10,43	0,58	0,42	0,54	0,15	0,1	0,1	0,3	
<b>(SE)</b>				(0,02)	(0,02)	(1,81)	(0,06)	(0,04)	(0,03)	(0,06)	(0,02)	(0,02)	(0,09)	

\* , campione MM1 come riferimento; <sup>§</sup> , senza M13(21)-tail 18 mer (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'), intervallo di dimensioni alleliche in paia di basi (bp); **P<sub>NA</sub>**, numero di popolazione con evidenza di alleli nulli utilizzando la stima della massima verosimiglianza (ML); **NAF<sub>-ML</sub>** and **NAF<sub>-ME</sub>**, frequenza allelica nulla utilizzando, rispettivamente, le stime di massima verosimiglianza (ML) e di massimizzazione dell'aspettativa (EM); **A<sub>T</sub>**, numero effettivo di alleli; **PIC**, contenuto informativo polimorfico; **H<sub>O</sub>**, eterozigosità osservata; **H<sub>E</sub>**, eterozigosità attesa; **Dest**, stima delle differenziazioni di Jost; **F<sub>ST</sub>**, (**F<sub>ST-ENA</sub>**); **F<sub>IS</sub>**, grado di consanguineità in ogni individuo rispetto alla sua popolazione locale; **HWE**, equilibrio di Hardy-Weinberg dopo correzione sequenziale di Holm-Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ) (test di probabilità, metodo di Fisher); \*\*,  $P < 0,001$ ; n.s., non significativo).

#### 4.2.1 Diversità genetica e struttura della popolazione

Come mostrato nella Tabella 2, il numero di alleli rilevati per locus varia da 4 a 17; il contenuto informativo polimorfico (PIC) è medio-alto con una media di 0,58 (SE  $\pm$  0,06). In breve, l' $H_O$  tra tutti i loci è di 0,42 (SE  $\pm$  0,04), con un intervallo di 0,21 (UC24) - 0,88 (UC39). L' $H_E$  varia da 0,26 (UC7) a 0,78 (UC39) con una media di 0,54 (SE  $\pm$  0,03). L'indice Dest varia da -0,003 (UC29) a 0,36 (UC3) con una media di 0,15 (SE  $\pm$  0,06). I valori  $F_{ST}$  variano da 0,02 (ENA 0,03) nel locus UC29 a 0,15 (ENA 0,14) nel locus UC3, con un valore medio di 0,1 ( $\pm$  SE 0,02) (lo stesso per ENA) e il valore  $F_{IS}$  in tutti i loci è 0,3 (SE  $\pm$  0,09), compreso tra -0,005 (UC7) e 0,61 (AG81). Due loci (UC7 e UC39) sono stati trovati all'equilibrio di Hardy-Weinberg; inoltre non c'è evidenza di linkage disequilibrium tra i 168 test SSR locus-by-locus nelle otto popolazioni, usando le correzioni sequenziali di Holm-Bonferroni. Inoltre, non è stata osservata alcun LD per ciascuna coppia di locus nelle otto popolazioni, secondo il metodo di Fisher.

I parametri di diversità genetica per le otto popolazioni di *Genista* sono riportati nella Figura 4. In breve, il numero di alleli diversi (NA) varia da 2,29 in Vicoli (codice V; *G. tinctoria* delle Mefite) a 6 nella popolazione di Torella boschiva (codice TB; *G. tinctoria*) e la NA totale è pari a 4,43 (SE  $\pm$  0,4).  $H_O$  varia da 0,29 nella popolazione di Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) a 0,57 nella popolazione Torella (codice TB; *G. tinctoria*), con un  $H_O$  totale di 0,42 (SE  $\pm$  0,03).  $H_E$  varia da 0,42 in Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) a 0,64 nella popolazione di Torella (codice TB; *G. tinctoria*), il valore totale è pari a 0,54 (SE  $\pm$  0,02). Valori simili sono stati ottenuti con la correzione della dimensione del campione (uHE) (dati non mostrati). La ricchezza allelica (AR) varia da 2,29 in Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) a 3,74 in Torella (codice TB; *G. tinctoria*), con un valore medio di 3,07 (SE  $\pm$  0,16). I valori di  $F_{IS}$  variano da 0,11 in una delle popolazioni campionate a S. Felicita (codice SF3; *G. tinctoria*) a 0,45 in Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) con una media totale moderata di  $F_{IS}$  (0,29 SE  $\pm$  0,04) (Tabella 2). Livelli moderati di consanguineità sono stati rilevati anche nella popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite ( $F_{IS} = 0,31$ ) (codice M) e in due delle popolazioni di *G. tinctoria*, ovvero S. Felicita e Torella (codici SF4 e TA; 0,34 e 0,32, rispettivamente). Livelli inferiori di  $F_{IS}$  sono stati documentati in due popolazioni di *G. tinctoria* (codici SF3 e TB;  $F_{IS} = 0,11$  e 0,15). La deviazione dalle proporzioni genotipiche di Hardy-Weinberg è stata osservata solo in una delle tre popolazioni localizzate a S. Felicita (codice SF3; *G. tinctoria*) dopo la correzione sequenziale Holm-Bonferroni, come mostrato nella Tabella 2.

Il test AMOVA per il set di dati completo ha mostrato che l'11% della variazione genetica totale è attribuito alle differenze tra le popolazioni e l'89% alle differenze tra gli individui all'interno delle popolazioni ( $F_{ST} = 0,11$ ,  $P < 0,001$ ). Escludendo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (cioè popolazione Mefite, codice M), la variazione nucleare nelle popolazioni di *G. tinctoria* è stata spiegata come attribuibile per il 10% alle differenze tra le popolazioni e per il 90% alle variazioni all'interno delle popolazioni ( $F_{ST} = 0,1$ ,  $P < 0,001$ ). La stima di differenziazione di Jost complessiva è pari a 0,15 e ciò indica che la proporzione di differenziazione allelica tra le popolazioni è leggermente superiore alla proporzione di varianza nelle frequenze alleliche ( $F_{ST} = 0,11$ ); questa differenza è simile quando la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (M) viene esclusa dal set di dati ( $Dest = 0,14$  vs  $F_{ST} = 0,1$ ).

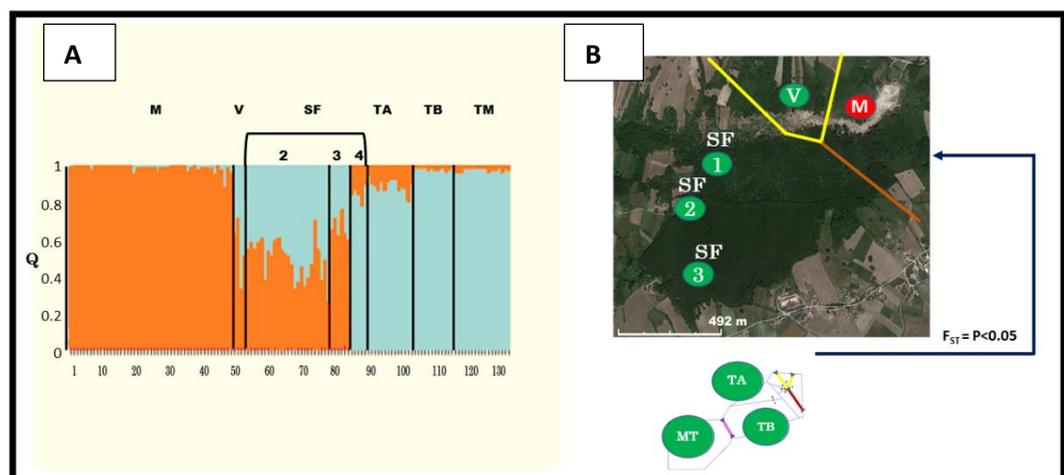
Valori di  $F_{ST}$  a coppie simili sono stati ottenuti correggendo o meno la presenza di alleli nulli, con un IC del 95% sovrapposto, come già osservato nei valori  $F_{ST}$  totali. I valori di  $F_{ST}$  della popolazione a coppie variano da un minimo di 0,003 (0,005 ENA) ad un massimo di 0,19 (0,16 ENA) nelle popolazioni di *G. tinctoria* SF2 vs SF4 e M vs TM (dati non mostrati). In dettaglio, il valore ottenuto della popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, rispetto alle popolazioni confinanti di *G. tinctoria* (codici V e SF2-4) ha presentato una differenziazione moderata con un  $F_{ST}$  pari a 0,09 ( $SE \pm 0,01$ ) ( $F_{ST-ENA} = 0,09$  e  $SE \pm 0,01$ ) varia da 0,06 (0,06 ENA) (codici M vs SF3) a 0,1 (0,12 ENA) (codici M vs. V) (dati non mostrati). Le tre popolazioni confinanti di *G. tinctoria* con il sito delle Mefite, presso S. Felicità (codici SF2-4) hanno mostrato una certa differenziazione genetica ( $F_{ST} = 0,01 \pm SE 0,02$ ;  $F_{ST-ENA} = 0,02 \pm SE 0,02$ ) con un minimo di 0,003 (0,005 ENA) (codici SF2 vs SF4) fino ad un massimo di 0,04 (0,06 ENA) (codici SF2 vs SF3).

Considerando la popolazione di Vicoli (codice V; *G. tinctoria*), che è più distante dalle popolazioni di S. Felicità (codici SF2-4; *G. tinctoria*) e separata da queste ultime dalla valle mefitica terminale, dove vi è il flusso tossico di fumi, la differenziazione genetica è risultata ancora moderata e pari a 0,12 ( $SE \pm 0,02$ ) (idem in  $F_{ST-ENA}$ ). Un valore più basso ( $F_{ST} = F_{ST-ENA} = 0,08$ ) è stato osservato tra Vicoli (codice V; *G. tinctoria*) e la popolazione più vicina di S. Felicità (codice SF2; *G. tinctoria*), fino ad un massimo di 0,13 e 0,15 con le altre due popolazioni meno vicine (codici SF4 e SF3; *G. tinctoria*) ( $F_{ST-ENA} = 0,14$  e 0,16).

Il test IBD globale, seppur con  $r$  positivo, non ha indicato alcuna correlazione significativa tra la differenziazione genetica e la distanza geografica, sia

considerando tutte le popolazioni di *Genista*, sia escludendo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (codice M) (rispettivamente  $r = 0,16$ , con  $P = 0,28$ ; e  $r = 0,11$ , e  $P = 0,18$ ;). Le stesse correlazioni di Mantel sono concordanti anche utilizzando  $F_{ST}$  a coppie corrette per alleli nulli ( $r = 0,21$ ,  $P = 0,24$ ; ed escludendo la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite  $r = 0,17$ ,  $P = 0,17$ ).

Il metodo di clustering bayesiano implementato in STRUCTURE ha identificato la partizione ottimale in due pool genetici ( $K = 2$ ), dove due cluster genetici (arancione e blu) risultano essere ben definiti nella popolazione delle Mefite (arancione; codice M, *G. tinctoria* delle Mefite) e nelle popolazioni più distanti dal sito delle Mefite (blu; codici TA, TB e MT, *G. tinctoria*) (Fig. 7A). Al contrario, popolazioni di *G. tinctoria* più vicine alla popolazione delle Mefite (cioè *G. tinctoria* delle Mefite, codice M) (codici V e SF2-3; Vicoli e S. Felicità popolazioni di *G. tinctoria*), mostrano un tipico pattern admixed, ovvero una mescolanza tra i pool genetici arancione e blu, con una frequenza leggermente maggiore per il pool genico arancione (codici V e SF2-3; *G. tinctoria*). Al contrario, la popolazione SF4, la più distante dalle Mefite tra le popolazioni limitrofe, mostra un genotipo predominante blu (Fig. 7A). La stessa topologia di cluster è stata osservata senza informazioni di campionamento (dati non mostrati).



**Figura 7:** (A) assegnazione percentuale ( $Q$  = coefficiente di appartenenza al cluster) di ciascun individuo a ciascuno dei due pool genetici nrDNA (arancione e celeste;  $K = 2$ ) ottenuti attraverso l'analisi degli SSR. Ogni barra rappresenta un individuo diverso, mentre la lunghezza di ogni segmento è proporzionale all'appartenenza stimata a ciascun pool genetico (B) mappa di distribuzione delle popolazioni di *G. tinctoria* delle Mefite (M) e di *G. tinctoria* (V, SF2, SF3, SF4, TA, TB ed MT). La linea rosa rappresenta la posizione della barriera significativa ( $F_{ST} = P < 0,05$ ), ottenuta utilizzando l'algoritmo di differenza massima di Monmonier, tra la popolazione del Monte Terminio e tutte le restanti popolazioni in esame. Le barriere gialla e marrone dividono la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite da quelle di *G. tinctoria* più prossime alla zona delle Mefite. La barriera gialla, inoltre, divide la popolazione V di *G. tinctoria* dalle altre popolazioni dello stesso tipo prossime, oltre che dalla popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite.

Sono state identificate tre barriere genetiche significative utilizzando l'algoritmo di Monmonier impiegato in BARRIER, inoltre i dati risultanti sono simili a quelli ottenuti con i dati plastidi. La popolazione delle Mefite (codice M; *G. tinctoria* delle Mefite) è stata divisa dalle popolazioni vicine di *G. tinctoria* (codici V e SF2-4) attraverso due barriere genetiche moderate (linee gialle e marrone) come mostrato nella Figura 7B. Un' altra barriera (rosa) è stata osservata con la popolazione Terminio (codice MT; *G. tinctoria*) che è più distante dalle altre popolazioni di *Genista*.

#### 4.2.2 Storia demografica

Le stime della dimensione effettiva delle popolazioni ( $N_e$ ), ottenute con il metodo LD devono essere considerate con cautela. Infatti, solo per la popolazione di Torella (cod. TA; *G. tinctoria*)  $N_e$  è risultato un valore basso ( $N_e = 10$  con 95%; CI = 3,3-32,3) e per la popolazione di Mefite (cod. M; *G. tinctoria* delle Mefite), con un valore più alto, ma ancora relativamente basso, di 59,5 anche se con un ampio intervallo di confidenza (IC 95% = 25-590). Nella popolazione più grande, campionata a S. Felicità (cod. SF2; *G. tinctoria*),  $N_e$  è uguale a 172, ma con un CI non informativo (32,5 -  $\infty$ ).

Nella parte restante del set di dati (popolazioni TB e MT; *G. tinctoria*), le analisi non sono riuscite a fornire una stima ( $N_e = \infty$ ). Per la popolazione delle Mefite (codice M; *G. tinctoria* delle Mefite), la dimensione della popolazione censita è di  $N_c = 115$  e il rapporto  $N_e/N_c$  è pari a 0,52.

Sulla base dei cambiamenti nella dimensione della popolazione, nelle popolazioni con  $n > 10$  (cioè, Mefite, S. Felicità2, Torella e Monte Terminio; codici M, SF2, TA-B e TM; Fig. 4), il test dei ranghi di Wilcoxon non ha rivelato alcun collo di bottiglia demografico recente sotto i tre modelli (IAM, SMM e TPM), ad eccezione di Torella (cod. TA), considerando IAM ( $P = 0,02$ ). Sono stati osservati valori bassi dell'indice G-W per tutte le popolazioni (Fig. 4), che vanno da 0,24 in Mefite (cod. M; *G. tinctoria* delle Mefite) a 0,28 in una delle popolazioni di Torella (cod. TB; *G. tinctoria*) (Figura 4), suggerendo una riduzione della dimensione della popolazione passata, essendo valori inferiori al valore critico di 0,68 (Garza & Williamson, 2001). Anche in questo caso non abbiamo ritenuto attendibili i valori G-W per popolazioni con meno di 10 campioni.

### **4.3 Il flusso genico: polline vs seme**

Sulla base dei valori di differenziazione genetica stimati per gli aplotipi plastidiali ( $F_{STm} = 0,67$ ) e per i microsatelliti nucleari ( $F_{STb} = 0,11$ ,  $F_{IS} = 0,29$ ), il flusso polline/seme ha mostrato un  $r = 19,19$  per tutte le popolazioni in studio, indicando che il flusso genico attraverso il polline è circa venti volte più efficiente della dispersione dei semi.

**CAPITOLO 5**  
**DISCUSSIONE E CONCLUSIONE**

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Virgilio nella sua Eneide, descrivendo le Mefite della Valle d'Ansanto come una delle possibili porte di accesso agli inferi, testimonia che le emissioni fredde di gas endogeni qui presenti esistono almeno da duemila anni. Probabilmente, però, i tempi sono ancora più remoti, come testimoniano le indagini archeologiche (es. Gambino, 1991; Sisto et al., 2020); inoltre, i riferimenti raccolti negli ultimi secoli (es. Di Capua, 1683; Santoli, 1783; Brocchi, 1820; Macchia, 1838; Gambino, 1991; Chiodini, 2010; Capano et al., 2015) suggeriscono che le emissioni di gas fossero continue già in quel periodo.

Al momento, la Mefite è descrivibile come l'unica mofeta al mondo con una così lunga ed antica testimonianza di attività, riportata in testi scritti. Pertanto, poiché esiste una lunga documentazione storica che data e localizza la Mefite nel passato, non vi è alcun rischio nell'affrontare l'utilizzo di questo sistema come “sistema modello” per chiarire gli effetti dell'arricchimento atmosferico di CO<sub>2</sub>.

Per di più, si può ragionevolmente ritenere che gli organismi che vivono nell'area delle Mefite siano stati sottoposti a condizioni estreme e abbiano affrontato lo sfogo dei gas per un tempo così lungo, da poter rappresentare degli ottimi modelli biologici (in quanto unici), per studiare diversi processi evolutivi, come l'adattamento o addirittura la differenziazione.

Oggi, grazie alle conoscenze disponibili sui fenomeni di differenziazione in popolazioni vegetali anche su piccola scala geografica (Turesson, 1914, 1922a-b, 1925; Linhart & Grant, 1996) e alle nuove tecniche di biologia molecolare (Freeland, 2020), possiamo comprendere e definire in modo più concreto i modelli evolutivi di questa popolazione scoperta nel XIX secolo e presente in uno dei più grandi siti con emissioni di CO<sub>2</sub> non vulcanici (Tenore, 1812; Chiodini et al., 2010). Nelle Mefite, infatti, si registrano forti variazioni delle caratteristiche ambientali su piccola scala, con un gradiente che ricorda più una netta divisione che un graduale cambiamento delle caratteristiche (Fig. 2) (Chiodini et al., 2010). Le variabili ambientali sono principalmente rappresentate e influenzate dall'emissione di gas delle Mefite, che agisce direttamente sugli individui di *Genista*. Lo stesso flusso di gas influenzerà indirettamente anche la vita degli individui in molti altri aspetti, come l'impollinazione e la dispersione del seme. Infatti, la presenza del pennacchio di gas tossico che può essere lungo fino a 500 m e alto 60 m (Chiodini et al., 2010) può essere considerato come una barriera “invisibile e inaspettata” in grado di separare gli esemplari anche su una scala locale (Fig. 2).

In questo studio sono stati utilizzati due tipi diversi di marcatori molecolari, per ottenere una chiara comprensione dei processi evolutivi della popolazione di *G. tinctoria* presente presso le Mefite della Valle d'Ansanto (*G. tinctoria* delle Mefite) e delle popolazioni limitrofe (*G. tinctoria*). L'uso combinato dei marcatori plastidiali e del DNA nucleare si è rivelato fondamentale perché, oltre alla diversa natura del loro meccanismo di ereditarietà (materno vs biparentale, ossia seme vs polline, rispettivamente), presentano anche diversi tassi di mutazione che consentono di esplorare diversi tempi evolutivi contemporaneamente nella stessa analisi (Freeland et al., 2012). In particolare, i microsatelliti nucleari sono stati utilizzati per risolvere i modelli del flusso genico recente e della corrispondente dispersione pollinica, a causa del loro alto tasso di mutazione (Marriage et al., 2009), mentre i marcatori plastidiali sequenziati con metodo Sanger hanno un tasso evolutivo inferiore e la mancanza di ricombinazione (Rousseau-Gueutin et al., 2018), fornendo così informazioni sulla dispersione dei semi nel passato e consentendo di avere, a volte, intuizioni diverse sulla storia evolutiva da marcatori di microsatelliti nucleari (ad es. De Castro et al., 2020).

Considerando i nostri risultati genetici, è evidente che la popolazione della Mefite (*G. tinctoria* delle Mefite) ha un pattern genetico esclusivo, sia dal punto di vista plastidiale che nucleare (Fig. 6B, 6A); con la presenza di barriere genetiche significative per entrambi i genomi analizzati, che indicherebbe un isolamento della popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite dalle vicine popolazioni di *G. tinctoria* (Fig. 6C, 7B).

Considerando i dati plastidiali, osserviamo un aplotipo diagnostico (rosso) esclusivo di *G. tinctoria* delle Mefite e che deriva, attraverso un singolo passaggio, da un aplotipo ubiquitario (verde) di *G. tinctoria* (Fig. 6 A-B). Inoltre, la presenza di quest'ultimo aplotipo (verde) è stata osservata anche in soli tre individui di *G. tinctoria* delle Mefite. Questi sono presenti nell'areale periferico (Fig. 6D), che corrisponde alla parte più terminale dell'area della valle dei Bagni (cioè l'estremità del Vado Mortale), che è contiguo ad alcune popolazioni di *G. tinctoria*, soprattutto alla località Vicoli (codice V, Fig. 4). Osservando la distribuzione aplotipica e la topografia ci si rende conto che questa parte dell'area periferica di *G. tinctoria* delle Mefite potrebbe essere stata l'unica area di contatto del seme con *G. tinctoria*.

Considerando solo le popolazioni di *G. tinctoria*, abbiamo osservato un IBD ( $r = 0,56$ ,  $P < 0,01$ ) causato dalla dispersione del seme (cpDNA); tuttavia, includendo anche la popolazione della Mefite, il test è diventato incongruente, ovvero non

significativo e con una correlazione negativa ( $r = - 0,14$ ,  $P = 0,48$ ). Inoltre, considerando anche le discrepanze ottenute dall'AMOVA con e senza la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, è ragionevole ipotizzare che nella Mefite si sia generato un meccanismo di dispersione dei semi diverso dai modelli classici osservati nelle popolazioni di *G. tinctoria* e che questo fenomeno abbia causato un isolamento di questa popolazione, con tutte le sue conseguenze evolutive.

Questa ipotesi è stata confermata anche dall'analisi delle barriere genetiche, considerando il flusso genico attraverso il seme (cpDNA) (Fig. 6C). Le barriere che si sono generate possono aver avuto diverse concause, ma molto probabilmente sono conseguenti ad una modifica del meccanismo di dispersione di *G. tinctoria* che avviene tramite bolocoria e mirmecoria (Pemberton & Irving, 1990; Stroh, 2015). Infatti, anche se tutti gli individui di *Genista*, sia *G. tinctoria* che *G. tinctoria* delle Mefite hanno un elaiosoma nei loro semi (O. De Castro, comunicazione personale), il ruolo delle formiche e di un'eventuale mirmecoria deve essere ancora confermato da uno studio dettagliato per la Mefite. Infatti, per *G. tinctoria* delle Mefite la dispersione per mirmecocoria potrebbe essere presente, ma condizionata da un'eventuale selezione anche sulle specie di formiche che riescono a vivere in questo ambiente estremo. Infatti, come dimostrato da Battaglini & Carbone (1981), per le Mefite è stata osservata una bassa biodiversità nella pedofauna. Inoltre, se la bolocoria fosse dominante tra i due metodi di dispersione per la *G. tinctoria* delle Mefite, la topografia dell'area delle Mefite renderebbe più difficile la fuga del seme da questo sito, per la presenza di ripidi pendii che caratterizzano entrambi i lati della valle.

I risultati plastidiali risultano congruenti con quelli dei marcatori nucleari, che hanno mostrato sia la presenza di barriere al flusso genico simili, sia pool genici esclusivi. Come mostrato nella Figura 7B, i risultati di BARRIER concordano perfettamente con il seguente scenario: gli individui di *G. tinctoria* delle Mefite sono chiaramente isolati dalle popolazioni di *G. tinctoria* limitrofe a causa degli addensamenti di gas, infatti, le barriere genetiche si riscontrano proprio laddove le concentrazioni di gas sono molto persistenti (Fig. 4 - 6C). Anche la presenza della barriera genetica tra le popolazioni di *G. tinctoria* limitrofe all'area delle Mefite (Vicoli vs S. Felicita; cod. V, SF2, SF3 e SF4), ben si adatta all'ipotesi della presenza di un muro tossico invisibile rappresentato dal pennacchio di gas. Sebbene la permeabilità di questa parete possa essere solo un evento casuale (ad es. dipendente dalle condizioni meteorologiche locali e temporanee), è ragionevole

pensare che la presenza di un fiume di gas più o meno continuo (Chiodini et al., 2010) è stato fondamentale nel generare le barriere che si osservano tra le popolazioni oggetto di studio.

In base alla struttura genetica dei dati nucleari si osservano due pool genetici ben definiti e caratterizzanti per *G. tinctoria* delle Mefite e per *G. tinctoria*, nonché un classico pattern misto riscontrabile in alcune delle popolazioni di *G. tinctoria* più vicine all'area di Mefite (Fig. 4), ossia gli individui di queste aree più limitrofe presentano sia il genotipo di *G. tinctoria* e quello di *G. tinctoria* delle Mefite.

Una delle possibili ipotesi per spiegare questo pattern ibrido è che ci sia stato o che ci sia ancora un flusso genico parziale, se si considerano le informazioni fornite dalle barriere, dai dati genetici nella loro interezza, nonché dalla distribuzione di *G. tinctoria* delle Mefite e dalla letteratura su questo territorio (Battaglini & Carbone, 1981; Chiodini et al., 2010). Questo flusso sarebbe riscontrabile principalmente verso l'esterno rispetto alle Mefite e potrebbe essere causato da insetti impollinatori specializzati o resistenti a breve termine in quel luogo tossico.

Infatti, i pochi insetti impollinatori presenti nell'area delle Mefite come gli Apidi (Battaglini & Carbone, 1981; De Castro O. & Di Iorio E., osservazioni inedite), hanno determinato la possibilità sia di un flusso genico interno alla popolazione, come evidenziato dalle statistiche F e dagli indici genetici di diversità (Fig. 4) nonché da un potenziale (ma modesto) flusso in uscita.

Il fenomeno opposto, cioè la presenza di un flusso genico del polline dalle popolazioni limitrofe di *G. tinctoria* verso l'area delle Mefite sembrerebbe assente, a causa della frequenza notevolmente bassa del genotipo nucleare arancione, caratteristico di *G. tinctoria* delle Mefite. Questo dato può portarci ad ipotizzare che la barriera rappresentata dai gas sia più selettiva verso l'interno che verso l'esterno. Infatti, come riportato da Battaglini & Carbone (1981), la composizione delle specie e delle popolazioni di insetti è profondamente influenzata dai gas tossici e la presenza di insetti morti nel fondo della vallata è stata segnalata da altri autori (Santoli, 1783; Gambino, 1991), ma non osservati da noi direttamente in campo.

Questa ipotesi ha portato a considerare che l'impollinazione può essere fortemente influenzata da diversi eventi stocastici imprevedibili, come l'aumento della direzione e dell'intensità del vento nel tempo, che potrebbero facilitare una direzionalità di queste barriere al flusso genico. Infatti, è possibile che, se si verificano le condizioni idonee per la dispersione e la diluizione del pennacchio

gassoso proveniente dalla fonte principale di emissione, gli insetti impollinatori possano facilmente raggiungere gli individui di *Genista*, solitamente circondati dal pennacchio di gas tossico. In questo caso possono essere in grado di svolgere il proprio ruolo di impollinatori o morire a seconda dei cambiamenti delle condizioni meteorologiche.

Pertanto, alla luce dei dati genetici ottenuti, è possibile confermare l'esistenza di un ecotipo per la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite. Ciò conferma la consolidata teoria secondo la quale potrebbe esserci una base genetica nella differenziazione delle popolazioni in ambienti differenti (Turesson, 1914, 1922a-b, 1925) e che la selezione operata da questo ambiente estremo sembra essere stata una forza fondamentale nel fenomeno della diversificazione, generando anche i morfotipi caratterizzanti *G. tinctoria* delle Mefite. Infatti, la morfologia degli individui della Mefite (cioè di *G. tinctoria* delle Mefite) mostra peculiarità tali da aver suggerito a Gussone e Tenore la descrizione di una nuova specie (Tenore, 1812, 1820) (Fig. 3). I risultati di questa ricerca non collimano con questa affermazione, in quanto seppure *G. tinctoria* delle Mefite è chiaramente isolata a causa dell'ambiente estremo, il suo isolamento risulta essere solamente parziale a causa della presenza di un flusso genico moderato con altre popolazioni al di fuori della Mefite (*G. tinctoria*). Questa evidenza ci consente, al momento, di confermare che *G. anxantica* rappresenta un ecotipo di *G. tinctoria*.

Saranno necessarie ulteriori ricerche per verificare la possibilità di applicare il rango di sottospecie a questa popolazione come, ad esempio, studiare eventuali modificazioni nella morfologia e nella fenologia dei fiori che possono svolgere un ruolo nell'instaurazione di altre barriere permanenti al flusso genetico e /o eseguire esperimenti ex situ per valutare la reale persistenza dei caratteri morfologici in *G. tinctoria* delle Mefite al di fuori dell'ambiente estremo.

L'insorgenza di una nuova unità evolutiva è soggetta al concorso di più di una pressione e, in questo caso, come già mostrato in letteratura (Linhart & Grant, 1996; Givnish, 2010), possiamo supporre che una limitata dispersione, soprattutto dei semi, favorisca la differenziazione genetica su piccole scale spaziali e che questo possa favorire una rapida speciazione ed un endemismo ristretto. Allo stesso modo, è possibile che la divergenza mostrata da *G. tinctoria* delle Mefite possa essere il risultato di consanguineità e deriva genetica, come conseguenza della piccola dimensione della popolazione e dell'isolamento ambientale.

Infatti, secondo le osservazioni in natura e i dati ottenuti, la causa di questo isolamento riproduttivo sembra essere dovuto del tutto al fattore ambientale che, se stabile nel tempo, forse, sarebbe sufficiente, insieme alla selezione e all'adattamento, a mantenere le differenze genetiche tra *G. tinctoria* delle Mefite e le popolazioni limitrofe di *G. tinctoria*, rendendo così possibile un fenomeno di speciazione paraptrica. Tale evento è probabilmente già in atto: il primo evento di fondazione si è potuto verificare in una probabile area di contatto tra l'area periferica di *G. tinctoria* delle Mefite e le popolazioni limitrofe di *G. tinctoria* (Fig. 6D). Da questo evento si sarebbe avuta una successiva dispersione verso l'intera area della Mefite e tale fenomeno è osservabile attraverso la presenza di un unico aplotipo plastidiale (rosso) (Fig. 6B-D). Una delle ipotesi che potrebbe spiegare questo evento per *G. tinctoria* delle Mefite è un probabile evento fondatore, avvenuto da parte di uno o più individui, adattati a questo ambiente estremo. Inoltre, una dispersione di polline da questa popolazione, presente nell'area di contatto con *G. tinctoria*, avrebbe favorito una diversità genetica nucleare nella popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, che nel frattempo si stava espandendo verso la principale zona di emissione di gas ancora attraverso una breve dispersione a distanza per mezzo di eventi di bolocoria ed eventualmente di mirmecoria.

Tuttavia, oltre al fattore di dispersione, che è stato alla base dell'evento di diversificazione, in questo caso anche l'isolamento ambientale deve aver giocato un ruolo importante nella selezione degli esemplari più idonei a sopravvivere esclusivamente nell'area mefitica, colonizzando il Vado Mortale (o torrente Bagni) arrivando a costeggiare la zona di emissione (lago mefitico), senza però addentrarsi nelle zone umide limitrofe che sono le nicchie tipiche di *G. tinctoria* (Fig. 4). Infine, oltre a questa particolarità, ovvero l'assenza di *G. tinctoria* delle Mefite in un diverso habitat presente a pochi metri di distanza, ad oggi non è mai stata descritta alcuna popolazione simile a quella di *G. tinctoria* delle Mefite in altre aree più lontane, ma che presentano condizioni di degassaggio estremi simili come, ad esempio, le Bolle della Malvizza a Montecalvo Irpino (Avellino) o le mofete di Oliveto Citra (Salerno). Queste aree si trovano a poche centinaia di km dalle Mefite della Valle d' Ansanto, tutte all'interno della regione Campania e presentano fenomeni geologici simili, come il degassamento naturale dal suolo (es. CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>).

Infine, dal punto di vista della conservazione della popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite, è utile sottolineare che la Valle d'Ansanto ha subito impatti antropici

ampiamente documentati durante differenti epoche storiche, che hanno determinato cambiamenti paesaggistici significativi anche nelle Mefite (Santoli, 1783; Macchia, 1838; Gambino, 1991). Come riportato da Totàro-Aloj in Gambino (1991), molti terreni dedicati alle coltivazioni sono stati abbandonati e si presume che buona parte di esse stiano tornando ad essere boschi, com'erano prima dei tempi in cui la zona era stata dedicata alla pastorizia. Sembra, infatti, che i feudatari romani e, poi, quelli medievali, bruciassero gli alberi per far crescere l'erba da pascolo. Anche dai "Capitoli Comunali" dei secoli XV-XVII si intuisce chiaramente che il terreno più vicino al centro urbano era intensamente coltivato a vigneto e frutteto (tutti recintati con siepi o muretti a secco), mentre le terre più lontane, come quelle occupate dalle Mefite erano adibite a pascolo (Gambino, 1991). Inoltre, più recentemente (1950) è stato progettato, e in parte realizzato, un intervento di consolidamento dovuto all'instabilità geologica dell'area in cui erano presenti i torrenti Rocca San Felice, che hanno generato frane ed erosioni (Totàro-Aloj in Gambino, 1991). Le opere di consolidamento hanno determinato un notevole cambiamento dell'ambiente naturale, con l'imbrigliamento dei corsi d'acqua, la regolazione delle acque piovane con erba e opportuni canali di scolo, il rimboschimento di ampie fasce laterali e vincoli idrologici per i campi nelle aree a rischio. Tale opera di consolidamento è stata effettuata in parte anche nella Valle d'Ansanto, ma solo per la parte del colle di S. Felicità che confina con il sito della Mefite ed escludendo così tutta l'area di quest'ultimo sito, dal torrente Bagni alla piccola pozza di fango mefitico.

L'evidenza dell'impatto antropico su tutta la Valle d'Ansanto potrebbe essere confermata anche dal valore dell'indice di Garza-Williamson (Figura 4), che dà l'indicazione di eventuali colli di bottiglia avvenuti in un arco di tempo lungo. Il valore di tale indice conferma la presenza di colli di bottiglia, non solo nella popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite (in questo caso causata da un probabile effetto fondatore), ma anche nelle popolazioni limitrofe di *G. tinctoria*, dove è evidente il carattere residuo causato da un probabile impatto antropico (es. taglio di boschi, manutenzione di strade, rimboschimenti ecc.). Paradossalmente, la popolazione di *G. tinctoria* delle Mefite è stata salvaguardata dall'impatto antropico, proprio grazie alla natura estremamente rischiosa dell'ambiente che occupa (ad eccezione degli scavi archeologici effettuati tra il 1953-1960; Gambino, 1991) e questo le ha consentito di sopravvivere sperimentando diverse alternative

evolutive rispetto a *G. tinctoria*, da cui però è evidente la sua diretta derivazione, come testimoniano i dati plastidiali ottenuti.

Alla luce di quanto qui esposto, va sottolineato l'estremo rischio di conservazione di questa popolazione nella Valle d'Ansanto, in quanto questo ecotipo è limitato sia per areale che per numero di individui, pari a ca. 100 esemplari ( $N_c$ ). Inoltre, tale precarietà è confermata anche dal valore di dimensione effettiva della popolazione prossima a 50 ( $N_e = 57$ ) che è al limite o addirittura inadatto a proteggere la popolazione nel breve periodo dagli effetti negativi della depressione da inbreeding (regola del 50/500 in Jamieson & Allendorf, 2012; o 100/1000 in Frankham, et al., 2014). Inoltre, questo ecotipo può essere considerato un'entità in pericolo critico secondo i parametri dell'IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Freeland, 2020). La fragilità di questa popolazione è però destinata ad aumentare nel tempo, anche per l'attenzione che il sito suscita dal punto di vista antropico (es. archeologia, consumo energetico dei gas; Sisto et al., 2020) ed è prioritario sviluppare piani di monitoraggio e protezione per un'entità così particolare e unica, che è riuscita a conquistare una nicchia così estrema.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Abatino E., De Simone B. 1974.** Visita alla Mefite di Ansanto (Avellino). *Le Scienze*. 5-6: 353-360.
- Adey ME. 1984.** Bee behavior in tripping some legume flowers. *Bee World*. 65: 62-67.
- Albertano P., Pollio A., Taddei R. 1994.** Ecophysiology and ultrastructure of an acidophilic species of *Ochromonas* (Chrysophyceae, Ochromonadales). *Arch. Protistenkd.* 144: 75–82.
- Alexander J.M., D' Antonio C.M.D. 2003.** Seed bank dynamics of French broom in coastal California grasslands: effects of stand age and prescribed burning on control and restoration. *Restor. Ecol.* 11(2): 185-197.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403-10.
- Bakker F.T., Culham A., Gomez-Martinez R., Carvalho J., Compton J., Dawtrey R., Gibby M. 2000.** Patterns of nucleotide substitution in Angiosperm cpDNA *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> regions. *Mol. Biol. Evol.* 17(8): 1146-1155.
- Battaglini P., Arcamone N. 1981.** Influenza delle alterazioni ambientali naturali sulla fauna fluviale del torrente “Bagni” (Valle d’Ansanto – AV). *Boll. Soc. Natur. Napoli.* 90: 203-216.
- Battaglini P., Carbone A. 1981.** La fauna del suolo di un terreno a condizioni ecologiche limiti (Valle di Ansanto, Avellino, Campania). *Boll. Soc. Natur. Napoli.* 90: 217-232.
- Battaglini P., Totàro-Aloj E. 1973.** Prime ricerche sulla pedofauna della mefite della valle “Valle di Ansanto”. *Boll. Soc. Natur. Napoli.* 28: 211-215.
- Bello M. A., Bruneau A., Forest F., Hawkins J. A. 2009.** Elusive relationships within order Fabales: phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequence data. *Syst. Bot.* 34(1): 102-114.
- Bello M.A., Rudall P.J., Hawkins J.A. 2012.** Combined phylogenetic analyses reveal interfamilial relationships and patterns of floral evolution in the eudicot order Fabales. *Cladistics.* 28: 393–421
- Bettarini I., Vaccari F.C., Miglietta F. 1998.** Elevated CO<sub>2</sub> concentrations and stomatal density: observations from 17 plant species growing in a CO<sub>2</sub> spring in central Italy. *Global Change Biol.* 4: 17-22.
- Birky C.W. 1995.** Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11331–11338.
- Borsch T., Hilu K.H., Quandt D., Wilde W., Neinhuis C., Barthlott W. 2003.** Non-coding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* 16: 558–576.

- Brinkmann B., Klintschard M., Neuhuber F., Huhne J., Rolf B. 1998.** Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Gen.* 62: 1408-1415.
- Brocchi G.V. 1820.** Osservazioni fisiche fatte nella Valle di Amsanto negli Irpini dal Signor Brocchi. *Biblioteca Italiana ossia Giornale di Letteratura Scienze ed Arti.* 17: 364-379.
- Brookfield J.F.Y. 1996.** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5: 453-455.
- Bruford M., Wayne W. 1993.** Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3: 939-943.
- Capano M., Pignatelli O., Capretti C., Lazzeri S., Pizzo B., Marzaioli F., Martinelli N., Gennarelli I., Gigli S., Terrasi F., Macchioni N. 2015.** Anatomical and chemical analyses on wooden artifacts from a Samnite sanctuary in Hirpinia (southern Italy). *J. Archaeol. Sci.* 57: 370-379.
- Chakraborty R., Kimmel M., Stivers D.N., Davison L.J., Deka R. 1997.** Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 1041-1046.
- Chapuis M.P., Estoup A. 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Chen I., Shii C., Chang T., Hwu K.K. 2018.** Development of 17 novel microsatellites markers for *Lycoris aurea* and *L. Radiata* (*Amaryllidaceae*) using next-generation sequencing. *Appl. Plant Sci.* 6(11): e1198.
- Chiodini G., Granieri D., Avino R., Caliro S., Costa A., Minopoli C., Vilardo G. 2010.** Non- volcanic CO<sub>2</sub> Earth degassing: case of Mefite d'Ansanto (southern Apennines), Italy. *Geophys. Res. Lett.* 37: L11303.
- Cinque A., Patacca E., Scandone P., Tozzi M. 1993.** Quaternary kinematic evolution of the southern Apennines. Relationship between surface geological features and deep lithospheric structures. *Ann. Geofis.* 36(2): 249-260.
- Clement M., Posada D., Crandall K. 2000.** TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10): 1657-1659.
- Cornuet J., Luikart G. 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* 144: 2001-2014.
- Corriveau J.L., Coleman A.W. 1988.** Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 Angiosperm species. *Am. J. Bot.* 75(10): 1443-1458.
- Cowan D., Tuffin M., Mulako I., Cass J. 2012.** Terrestrial Hydrothermal Environments. In: Bell E.M. ed. *Life at extremes: Environments, organisms and strategies for survival.* Wallingford: CABI. 219-241.

- Cronquist A. 1981.** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York, USA
- Crozier R.H., Agapow P.M., Pedersen K. 1999.** Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:325-334.
- Csedö K., Fülöp L., Gáspár M. 1981.** Pharmacognostical researches for the therapeutic use of *Genista tinctoria*. *Planta Med.* 42(6): 143.
- Dabrowski M.J., Bornelöv S., Kruczyk M., Baltzer N., Komorowski J. 2015.** ‘True’ null allele detection in microsatellite loci: a comparison of methods, assessment of difficulties and survey of possible improvements. *Mol. Ecol. Res.* 15: 477-488.
- Dabrowski M.J., Pilot M., Kruczyk M., Zmihorski M., Umer H.M., Gliwicz J. 2014.** Reliability assessment of null allele detection: inconsistencies between and within different methods. *Mol. Ecol. Res.* 14: 361-373.
- Dakin E.E., Avise J.C. 2004.** Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* 93: 504-509.
- Davis T., Parsons M., Rowsell E. 2013.** Dyer’s Greenweed: A key plant for moths and other insects. Butterfly Conservation Factsheet. Butterfly Conservation, Wareham, Dorset.
- De Castro O., Innangi M., Menale B. 2020.** Message in a bottle: the Mediterranean Sea currents acted as protagonists in shaping the distribution of the sea daffodil (*Pancretium maritimum*, Amaryllidaceae). *Bot. J. Linn.* 194: 207-220.
- Dempster A.P., Laird N.M., Rubin D.B. 1977.** Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 39: 1-38.
- DeWoody J., Nason J.D., Hipkins V.D. 2006.** Mitigating scoring errors in microsatellite data from wIBD populations. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 95-57.
- Di Capua L. 1683.** Lezioni intorno alla natura delle Mofete. Salvatore Castaldo Regio Stampatore.
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M. 1994.** Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 3166-3170.
- Do C., Waples R.S., Peel D., Macbeth G.M., Tillett B.J., Ovenden J.R. 2014.** NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol. Ecol. Resour.* 14: 209-214.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda, J. 2007.** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2: 2233-2244.

- Downie S.R., Palmer J.D. 1992.** Use of Chloroplast DNA Rearrangements in Reconstructing Plant Phylogeny. In: Soltis P.S., Soltis D.E., Doyle J.J. (eds) *Molecular Systematics of Plants*. Springer, Boston, MA.
- Doyle J.J. 2001.** Leguminosae, *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press.
- Doyle J.J., Luckow M.A. 2003.** The rest of iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Duchi V., Minissale A., Vaselli O., Ancillotti M. 1994.** Hydrogeochemistry of the Campania region in southern Italy. *J Volcanol. Geotherm. Res.* 67: 313-328.
- Earl D.A., von Holdt B.M. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Ellegren H. 2004.** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5: 435-445.
- Ennos R.A. 1994.** Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity.* 72: 250-259.
- Estoup A., Jarne P., Cornuet J.M. 2004.** Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.* 11: 1591-1604.
- Etcheverry A.V., Aleman M.M., Fleming T.F. 2008.** Flower morphology, pollination biology and mating system of the complex flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoideae). *Ann. Bot.* 102:305-316.
- 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.
- Evans H.J., Russell S.A. 1971.** Physiological chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legumes. In: Postgate J.R. (eds) *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Springer, Boston. 191-244.
- 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.
- Frankham R., Bradshaw C.J.A., Brook B.W. 2014.** Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol. Conserv.* 170: 56-63.
- Freeland J.R., Kirk H., Petersen S. 2012.** *Molecular ecology*, 2nd Edition. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Freeland J.R. 2020.** *Molecular Ecology*, 3rd Edition. Hoboken: Wiley Balckwell.

- Frodin D.G., Heywood V.H. 1968.** *Cytisus* L. In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., eds. Flora Europea. 2-86. Cambridge University Press.
- Gaetano J. 2018.** Holm-Bonferroni sequential correction: An EXCEL calculator (1.3) (Microsoft Excel workbook). Available from: <https://bit.ly/2VQOqcn>. Accessed December 2020.
- Galdi B. 1931.** La Valle d'Ansanto nella legenda e nella storia ed il petrolio di Frigento. Modena: Antica Tipografia Soliani.
- Galloni M., Podda L., Vivarelli D., Cristofolini G. 2007.** Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean Legumes (Fam. Fabaceae - Subfam. Faboideae). *Plant Syst. Evol.* 266(3/4): 147-164.
- Gambino N. 1991.** La Mefite nella Valle d'Ansanto di Vincenzo Maria Santoli: rilettura dopo duecento anni: 1783-1983, vol. 2. Avellino: Tipografia GraficAmodeo.
- Gardner M.G., Bull C.M., Cooper S.J.B., Duffield. 2000.** Microsatellite mutations in lizard litters. *J. Evol. Biol.* 13: 551-560.
- Garza J.C., Statkin M., Freimer N.B. 1995.** Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.* 12: 594-603.
- Garza J.C., Williamson E.G. 2001.** Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: 305-318.
- Gauthier P., Lumaret R., Bedecarrats A. 1997.** Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *Theor. Appl. Genet.* 95 :629-636
- Ghirardelli A., Rizzi Longo L., Chiapella F. 2006** Pollen morphology and taxonomy of *Genista* sect. *Cephalospartum* Spach emend P. Gibbs (Genisteae, Fabaceae). *Flora Mediterranea*, 16: 169-191.
- Gibbs P.E. 1966.** A revision of the genus *Genista* L. *Notes Roy. Bot. Gard Edinburgh.* 27: 11-99.
- Givnish T.J. 2010.** Ecology of plant speciation. *Taxon.* 59: 1326-1366.
- Goldstein D.G., Pollock D.D. 1997.** Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* 88: 335-342.
- Gómez F. 2011.** Extreme Environment. In: Gargaud M, Amils R, Quintanilla JC, Cleavesll HJJ, Irvine WM, Pinti DL, Viso eds. *Encyclopedia of Astrobiology*. Berlin: Springer.

- Goudet J. 2003.** FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from: <http://www.t-de-meeus.fr/Programs/Fstat294.zip>. Accessed December 2020.
- Hansen H., Escobar L.K., Gilbert L.E., Jansen R.K. 2007.** Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. *Am. J. Bot.* 94: 42-46.
- Haworth M., Gallagher A., Elliott-Kingston C., Raschi A., Marandola D., McElwain J. C. 2010.** Stomatal index responses of *Agrostis canina* to CO<sub>2</sub> and sulphur dioxide: implications for palaeo- [CO<sub>2</sub>] using the stomatal proxy. *New Phytolog.* 188: 845-855.
- Holm S. 1979.** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. Stat. Theory Appl.* 6: 65-70.
- Hubisz M., Falush D., Stephens M., Pritchard J. 2009.** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resources.* 9: 1322-1332.
- Improta L., De Gori P., Chiarabba C. 2014.** New insights into crustal structure, Cenozoic magmatism, CO<sub>2</sub> degassing, and seismogenesis in the southern Apennines and Irpinia region from local earthquake tomography. *J. Geophys. Res. Solid Earth.* 119: 8283-8311.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007.** CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 23: 1801-1806.
- Jamieson I.G., Allendorf F.W. 2012.** How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends Ecol. Evol.* 27: 578-584.
- Jarne P., Lagoda P.J.L. 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11: 424-430.
- Judd W. S., Campbell C.S., Kellogg E. A., Stevens P.F. 2019.** *Botanica Sistemica: un approccio filogenetico.* Padova: Piccin.
- Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. 2011.** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* 177: 309-334.
- Kalinowski S.T., Taper M.L. 2006.** Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Cons. Genet.* 7: 991-995.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. 2007.** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- Källersjö M., Farris J.S., Chase M.W., Bremer B., Fay M.F., Humphries C.J., Petersen G., Seberg O., Bremer K. 1998.** Simultaneous parsimony jackknife analysis of 2538 *rbcL* DNA sequences reveals support for major clades of green plants, land plants, seed plants and flowering plants. *Pl. Syst. Evol.* 213: 259-287.

- Keys R.N., Smith S.E., Lloyd Mooensen H., Small E. 1995.** Microgametophytic plastid nucleoid content and reproductive and life history traits of tribe *Trifolieae* (Fabaceae). *Pl. Syst. Evol.* 196:89-98.
- Kimura M., Crow J. 1964.** The Number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics.* 49: 725-738.
- Kleist A., Herrera-Reddy A.M., Sforza R., Jasieniuk M. 2014.** Inferring the complex origins of horticultural invasives: French broom in California. *Biol. Inv.* 16: 887-901.
- Kruckeberg A.R. 1986.** An essay: The stimulus of unusual geologies for plant speciation. *Syst. Bot.* 11: 455-463.
- Linhart Y.B., Grant M.C. 1996.** Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 27: 237-277.
- Lopez J., Rodriguez-Riano T., Ortega- Olivencia A., Deversa J.A., Ruiz T. 1999.** Pollination mechanism and pollen-ovule ratios in Genisteae (*Fabaceae*) from southwestern Europe. *Plant Syst. Evol.* 216:23-47.
- Łuczkiwicz M., Kokotkiewicz A. 2005.** Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Science.* 169:862-871.
- Macchia P. 1838.** Sulla Valle di Ansanto e sulle acque termo-minerali di Villamaina in Principato Ultra. Napoli: Tipografia del Filiatre-Sebezio.
- MacElroy R.D. 1974.** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems.* 6: 74-75.
- Maiuri A. 1953.** Cadono stecchiti gli uccelli al soffio della Dea Mefite. *Corriere della Sera*, 17/10/1953 (articolo di giornale).
- Manni F., Guérard E., Heyer E. 2004.** Geographic patterns of (Genetic, Morphologic, Linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's Algorithm. *Human Biology.* 76: 173-190.
- Manzi R. 1997.** Emanazioni gassose e sorgenti minerali della Valle d'Ansanto. Napoli: Laurenziana.
- Marriage T., Hudman S., Mort M.E., Orive M.E., Shaw R.G., Kelly J.K. 2009.** Direct estimation of the mutation rate at dinucleotide microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Heredity.* 103: 310-317.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. 1998.** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- Martin E., Dinc M., Duran A., Dogan B., Hakki E.E. 2009.** Cytogenetical analysis of 12 taxa of *Genista* L. (*Fabaceae*) from Turkey Bangladesh *J. Plant Taxon.* 16(2): 151-156.

- Marzaioli F., Lubritto C., Battipaglia G., Passariello I., Rubino M., Rogalla D., Strumia S., Miglietta F., D'Onofrio A., Cotrufo M.F., Terrasi F. 2005.** Reconstruction of past CO<sub>2</sub> concentration at a natural CO<sub>2</sub> vent site using radiocarbon dating of tree rings. *Radiocarbon* 47: 257-263.
- McEwens J.R., Vamosi J.C., Rogers S.M. 2011.** Rapid isolation and cross-amplification of microsatellites markers in *Plectritis congesta* (*Valerianaceae*) with 454 sequencing. *Am. J. Bot.* 0: e369-e371.
- Mele A. 2008.** Il culto della Dea Mefite e la Valle d'Ansanto: ricerche su un giacimento archeologico e culturale dei Samnites Hirpini. Avellino: Elio Sellino.
- Miglietta F., Raschi A., Bettarini I., Resti R., Selvi F. 1993.** Natural CO<sub>2</sub> springs in Italy: a resource for examining long-term response of vegetation to rising atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Cell Env.* 16: 873-878.
- Minissale A. 2004.** Origin, transport and discharge of CO<sub>2</sub> in Central Italy. *Earth Sci Rev.* 66: 89-141.
- Molinaro F. 2017.** *Genista anxantica* Ten. Proposta per la rielezione a specie di una specie endemica senza carta d'identità. Napoli: LFA Publischer.
- Monmonier M. 1973.** Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geogr. Anal.* 3: 245-261.
- Neophytou C., Torutaeva E., Winter S., Meinberg H., Hasenauer H., Curto M. 2018.** Analysis of microsatellite loci in tree of heaven (*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle) using SSR-GBS. *Tree Genet. Genomes.* 14:82
- Onoda Y. 2007.** Natural CO<sub>2</sub> springs: Natural laboratory to study long-term response to elevated CO<sub>2</sub>. *Japanese J. Ecol.* 57: 145-158.
- Onorato G.O. 1960.** La ricerca archeologica in Irpinia. Avellino: Amministrazione provinciale.
- Ortolani F., De Gennaro M., Ferreri M., Ghiara M.R., Stanzione D., Zenone F. 1981.** Prospettive geotermiche dell'Irpinia centrale (Appennino meridionale); studio geologico-strutturale e geochimico. *Boll. Soc. Geol. Ital.* 100: 139-15.
- Palmer J.D. 1985.** Chloroplast DNA and molecular phylogeny. *Bioessays.* 2: 263-267.
- Paoletti E., Pfanz H., Raschi A. 2005.** Pros and cons of CO<sub>2</sub> springs as experimental sites. In: Omasa K., Nouchi L.I., De Kok J., eds. *Plant responses to air pollution and global change.* Tokyo: Springer-Verlag. 195-202.
- Pardo C., Cubas P., Tahiri H. 2004.** Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (*ITS* region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Syst. Evol.* 244 (1/2): 93-119.

- Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M., Rafalski A. 1998.** Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1275-1287.
- Peakall R., Smouse P.E. 2012.** GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics.* 28: 2537-2539.
- Pemberton R.W., Irving D.W. 1990.** Elaiosomes on weed seeds and the potential for myrmecochory in naturalized plants. *Weed Sci.* 38: 615-619.
- Petit R.J. 1992.** Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces: les chênes blancs européens. Doctorate Thesis, Paris XI-Orsay.
- Petit R.J., El Mousadik A., Pons O. 1998.** Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.* 12: 844-845.
- Pignatti S. 1997.** Flora d'Italia, vol. 3. Bologna: Edagricole.
- Pignatti S. 2017.** Flora d'Italia, vol. 2. Bologna: Edagricole.
- Pinto G., Pollio A., Taddei R. 1992.** List of algae from low pH environments cultivated at the University "FedericoII" at Naples (Italy). *Boll. Soc. Adr. Sci.* LXXII: 5-24.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. 1999.** Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90: 502-503.
- Pischiutta M., Anselmi M., Cianfarra P., Rovelli A., Salvini F. 2013.** Directional site effects in a non-volcanic gas emission area (Mefite d'Ansanto, southern Italy): evidence of a local transfer fault transversal to large NW–SE extensional faults? *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 63: 116-123.
- Prince M.L. 2015.** Plastid primers for angiosperm phylogenetics and phylogeography. *Appl. Plant Sci.* 3(6): 1400085.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945-959.
- Provan J., Powell W., Hollingsworth P.M. 2001.** Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 16: 142-147.
- Quandt D., Muller K.F., Stech M., Hilu K.W., Frey W., Frahm J.P., Borsch T. 2004.** Molecular evolution of the chloroplast *trnL-F* region in land plants. *Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Ga.* 98: 13-37.
- Quandt D., Stech M. 2004.** Molecular Evolution of the *trnT*<sup>(UGU)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> region in *Bryophytes*. *Plant Biol.* 6: 545-554.

- Queney G., Ferrand N., Weiss S., Mougat F., Monnerot M. 2001.** Stationary distributions of microsatellite loci between divergent population groups of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Mol. Biol. Evol.* 18:2169-2178.
- Ramasamy R.K., Ramasamy S., Bindroo B.B., Naik V.G. 2014.** STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus.* 3: 431.
- Raven P.H. 1964.** Catastrophic selection and edaphic endemism. *Evolution.* 18: 336-338.
- Rega M. 2008.** Filogenesi del genere *Genista* L. (*Fabaceae*): evidenze molecolari e morfologiche. PhD Thesis. Università degli Studi di Napoli Federico II. Available from: <http://www.fedoa.unina.it/1725/>. Accessed December 2021.
- Rice W.R. 1989.** Analysing tables of statistical tests. *Evolution.* 43: 223-225.
- Ronquist F., Huelsenbech J.P. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19(12): 1572-1574.
- Rothschild L.J., Mancinelli R.L. 2001.** Life in extreme environments. *Nature.* 409:1092-1110.
- Rousseau-Gueutin M., Keller J., Ferreira de Carvalho J., Aïnouche A., Martin G. 2018.** The intertwined chloroplast and nuclear genome coevolution in plants. In: Ratnadewi D, Hamim H, eds. *Plant growth and regulation-alterations to sustain unfavourable conditions.* London: IntechOpen Limited. 61-84.
- Rousset F. 1997.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics.* 145: 1219-1228.
- Rousset F. 2008.** GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 103-106.
- Santoli V.M. 1783.** *De Mephiti et Vicolibus Anxanti libri tres.* Napoli.
- Savolainen V., Chase M.W., Hoot S.B., Morton C.M., Soltis D.E., Bayer C., Fay M.F., De Bruijn A.Y., Sullivan S., Qiu Y.-L. 2000.** Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Syst. Bio.* 49(2): 306-362.
- Schuelke M. 2000.** An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology.* 18: 233-234.
- Shinde D., Lai Y., Sun F., Arnheim N. 2003.** Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acid Research.* 31: 974-980.
- Sisto M., Di Lisio A., Russo F. 2020.** The Mefite in the Ansanto Valley (Southern Italy): a geoarchaeosite to promote the geotourism and geoconservation of the Irpinian cultural landscape. *Geoheritage.* 12: 29.

- Slatkin M. 1995.** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Spach E.1844.** Revisio generis *Genista*. I. *Ann. Sci. Nat. (Paris)*. 2.:237-279.
- Spach E.1845.** Revisio generis *Genista*. II. *Ann. Sci. Nat. (Paris)*. 3:102-158.
- Stevens P.F. (2001 onwards).** Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]." will do. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Stroh P.A. 2015.** *Genista tinctoria* L. Dyer's Greenweed. Species Account. BSBI.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105-1109.
- Taheri S., Abdullah T.L., Yusop M.R., Hanafi M.M., Sahebi M., Azizi P., Shamshiri R.R. 2018.** Mining and development of novel SSR markers using Next Generation Sequencing (NGS) data in plants. *Molecules*. 23:399.
- Talavera S. 1999.** *Cytiseae*. In: Talavera S. et al. (eds.) *Flora iberica* 7(1). Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. 44-260.
- Tallury S.P., Hilu K.W., Milla S.R., Friend S.A., Alsaghir M., Stalker H.T., Quandt D. 2005.** Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1229-1237.
- Tausch S., Leipold M., Reisch C., Poschlod P. 2019.** Dormancy and endosperm presence influence the ex-situ conservation potential in central European calcareous grassland plants. *AoB PLANTS*. 11: plz035.
- Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F. 1992.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 132: 619-633.
- Tenore M. 1812.** *Flora Napolitana*, vol. 1, Tomo XLI. Napoli: Stamperia Francese.
- Tenore M. 1820.** *Flora Napolitana*, vol. 1, Tomo II. Napoli: Tipografia del Giornale Enciclopedico.
- Totàro-Aloj E. 1973.** Il microambiente della mefitite della Valle d'Ansanto. *Boll. Soc. Natur. Napoli*. 82: 241-253.
- Turesson G. 1914.** The cause of plagiotropy in maritime shore plants. *Bull. Torrey Bot. Club*. 41: 337-345.
- Turesson G. 1922a.** The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas*. 3: 211-350.

- Turesson G. 1922b.** The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas.* 3: 211-350.
- Turesson G. 1925.** The plant species in relation to habitat and climate. *Hereditas.* 6: 147-236.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004.** MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4: 535-538.
- Vance C.P. 1998.** Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- Walker A.P., De Kauwe M.G., Bastos A., Belmecheri S., Georgiou K., Keeling R.F., McMahon S.M., Medlyn B.E., Moore D.J.M., Norby R.J., Zaehle S., Anderson-Teixeira K.J., Battipaglia G., Brienen R.J.W., Cabugao K.G., Cailleret M., Campbell E., Canadell J.G., Ciais P., Craig M.E., Ellsworth D.S., Farquhar G.D., Fatichi S., Fisher J.B., Frank D.C., Graven H., Gu L., Haverd V., Heilman K., Heimann M., Hungate B.A., Iversen C.M., Joos F., Jiang M., Keenan T.F., Knauer J., Körner C., Leshyk V.O., Leuzinger S., Liu Y., MacBean N., Malhi Y., McVicar T.M., Penuelas J., Pongratz J., Powell A.S., Riutta T., Sabot M.E.B., Schleucher J., Sitch S., Smith W.K., Sulman B., Taylor B., Terrer C., Torn M.S., Treseder K.K., Trugman A.T., Trumbore S.E., van Mantgem P.J., Voelker S.L., Whelan M.E., Zuidema P.A. 2020.** Integrating the evidence for a terrestrial carbon sink caused by increasing atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytologist.* 5: 2413-2445.
- Waloff N. 1968.** Studies on the insect fauna on Scotch broom, *Sarothamnus scoparius*. *Adv. Ecol. Res.* 5: 88-208.
- Wang H., M.J., Soltis P.S., Bell C.D, Brockington S.F., Alexandre R., Davis C.C., Latvis M., Manchester S.R., Soltis D.E. 2009.** Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *PNAS.* 106(10): 3853-3858.
- Waples R.S., Do C. 2010.** Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evol. Appl.* 3: 244-262.
- Westhoff P., Herrmann R.G. 1987.** Complex RNA maturation in chloroplast. The *psbB* operon from spinach. *Eur. J. Biochem.* 171: 551-564.
- Wink M., Meißner C., Witte L. 1995.** Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of genus *Lupinus*. *Phytochemistry.* 38: 139-153.
- Wolfe K.H., Lee W.H., Sharp P.M. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondria, chloroplast and nuclear DNAs. *PNAS.* 84: 9054-9058.
- Wright S. 1943.** Isolation by distance. *Genetics.* 28: 114-138.

**Xu X., Peng M., Fang Z., Xu X. 2000.** The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics*. 24:396-399.

**Zhang Q., Liu Y., Sodmergen. 2003.** Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 Angiosperm species. *Plant Cell Physiol*. 44: 941-951.

## **APPENDICE**

## A.1 I noduli radicali

I noduli radicali sono il risultato dell'associazione simbiotica tra le radici delle piante appartenenti alla famiglia delle Fabaceae e batteri, per la maggior parte, del genere *Rhizobium* Frank 1889, *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, *Mesorhizobium* Jarvis et al. 1997, *Azorhizobium* Dreyfus et al. 1988 e *Bradyrhizobium* Jordan 1982. Questi batteri, Gram negativi, sono capaci di fissare l'azoto atmosferico e cederlo alla pianta in cambio di carbonio in forma organica (Poole & Allaway, 2000).

In seguito all'infezione batterica, le cellule corticali interne iniziano a dividersi, formando un nodulo che può avere forma variabile, generalmente sferica o cilindrica. Durante la simbiosi, i batteri invadono i noduli in via di sviluppo e, all'interno di alcune cellule nodulari, si differenziano in batteroidi. Uno o più batteroidi, circondati dalla membrana peribatteroidale, formano strutture organello-simili, i simbiosomi, che convertono l'azoto atmosferico (N<sub>2</sub>), non utilizzabile, in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ricevendo in cambio energia dalla pianta ospite. L'azoto fissato è allora esportato, assimilato e trasportato al resto della pianta (Patriarca et al., 2002).

Grazie a questa simbiosi le *Fabaceae* riescono ad essere indipendenti nell'approvvigionamento dell'azoto, che altrimenti dovrebbero acquisire esclusivamente dal suolo come tutte le altre piante.

Le combinazioni tra i generi batterici presenti nei noduli radicali e le piante ospiti dipendono fortemente dalle caratteristiche chimico-fisiche del suolo in cui questa simbiosi avviene, come documentato in molti studi su *Phaseolus vulgaris* L. (Silva et al., 2020; Tamimi & Young, 2004; Cao et al., 2014; Romàn-Ponce et al., 2015; Mnasri et al., 2012) e su *Glycine max* (L.) Merr. (Man et al., 2008; Han et al., 2009; Appunu et al., 2008).

Studi recenti, inoltre, hanno evidenziato la presenza nei noduli radicali di un ampio spettro di Gram positivi e negativi. Tra questi vanno annoverati batteri endofitici Gram positivi appartenenti al genere *Micromonospora* Ørskov 1923, che risiedono nei noduli radicali in maniera ubiquitaria e con un elevato tasso di diversità genetica: sono stati trovati in *Lupinus angustifolius* L., *Pisum sativum* L. e *Medicago sativa* L. (Martinez-Hidalgo et al., 2019). I batteri appartenenti a tale genere non sono in grado di fissare l'azoto in simbiosi con la pianta ospite, ma promuovono la crescita aerea delle piante, consentono un aumento del rapporto germoglio\radice, sostengono la raccolta di elementi essenziali (C, N, P e K) ed offrono un effetto probiotico alla pianta ospitante, come dimostrato in Martinez-Hidalgo et al. (2014).

La simbiosi con i batteri nodulatori è specie-specifica (Fred et al., 1932); questa specificità è determinata dai geni nodulatori, trasferibili tra differenti specie di batteri. Infatti, differenti specie di batteri nodulatori che sono determinati dagli stessi geni o geni simili, chiamati *symbiovar*, possono nodulare con le stesse specie di leguminose (Veràstegui-Valdés et al., 2014). Per quel che concerne *G. tinctoria* è ampiamente documentato in letteratura la simbiosi con batteri del genere *Bradyrhizobium* (Kalita et al., 2004 – 2006 - 2010 - 2017 - 2020).

## A.2 I Rizobi

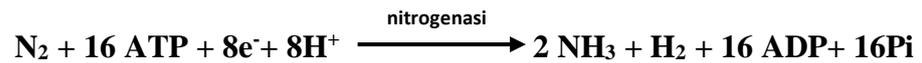
Per rizobi intendiamo tutti i batteri simbiotici azoto-fissatori; questi rientrano nel phylum Proteobacteria e sono distribuiti nelle classi Alphaproteobacteria ( $\alpha$ -rizobi), Betaproteobacteria ( $\beta$ -rizobi) e Gammaproteobacteria ( $\gamma$ -rizobi), con circa 180 specie distribuite in 21 generi (Wang et al., 2019).

Gli  $\alpha$ -rizobi sono il gruppo più comune, con una distribuzione molto ampia per quel che riguarda la distribuzione geografica e le piante ospiti, anche i  $\beta$ -rizobi sono ben consolidati, sebbene siano meno diffusi. L'esistenza dei  $\gamma$ -rizobi, attualmente, risulta essere controversa: ci sono stati numerosi ceppi di *Pseudomonas* isolati nei noduli radicali (Shiraishi et al., 2010), ma il loro status di rizobi non è ancora stato confermato. La classe degli Alphaproteobacteria comprende 16 generi e 7 famiglie: nella famiglia Rhizobiaceae si riscontrano i generi *Agrobacterium* (Conn 1942), *Allorhizobium* (de Lajudie et al. 1998), *Ensifer* (Casida 1982) (formalmente *Sinorhizobium*), *Neorhizobium* (Mousavi et al. 2015), *Pararhizobium* (Mousavi et al. 2016), *Rhizobium* e *Shinella* (An et al. 2006); nella famiglia Phyllobacteriaceae i generi *Aminobacter* (Urakami et al. 1992), *Phyllobacterium* (Knösel 1984) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al. 1997); nella famiglia Bradyrhizobiaceae il genere *Bradyrhizobium*; nella famiglia Methylobacteriaceae i generi *Microvirga* (Kanso & Patel 2003) e *Methylobacterium* (Patt et al. 1976); nella famiglia Brucellaceae il genere *Ochrobactrum* (Holmes et al. 1988); il genere *Devosia* (Nakagawa et al. 1996) nella famiglia Hyphomicrobiaceae; nella famiglia Xanthobacteraceae il genere *Azorhizobium* (Dreyfus et al. 1988).

Tutti questi sono membri dell'ordine Rhizobiales, nel quale sono incluse anche le famiglie Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Cohaesibacteraceae, Methylocystaceae, Rhodobiaceae e Roseiarcaceae.

La fissazione dell'azoto è un fenomeno antico, evolutosi quando il pianeta Terra era anossico (200 milioni di anni fa); l'evoluzione ha lavorato a lungo su queste forme di vita la cui forma più vicina allo stato ancestrale pare sia il genere *Bradyrhizobium* (Lloret & Martínez-Romero, 2005). Infatti, secondo le relazioni filogenetiche stimate per mezzo dello studio della glutammina I e II (GSI e GSII), questi si sono evoluti prima dell'evoluzione delle leguminose, ovvero intorno ai 400 milioni di anni fa. Tali stime sono supportate anche da alcuni fenomeni noti nei rizobi, come la fissazione dell'azoto in condizioni di vita libera, rilevata in alcuni ceppi di *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Lloret & Martínez-Romero, 2005).

Tutti i rizobi sono Gram negativi, bastoncini non sporigeni, si muovono con uno o più flagelli polari o peritrichi. Tutti possono fissare l'azoto atmosferico, mediante l'attività del complesso della nitrogenasi. Tale complesso è formato dalla nitrogenasi e della nitrogenoriduttasi. Nei batteri azotofissatori a vita libera la nitrogenasi comprende due subunità per il co-fattore Fe-Mo e due subunità per il Fe, mentre la nitrogenoriduttasi contiene due subunità uguali per il Fe (Hoffman et al., 2014). Questi enzimi conducono la riduzione dell'azoto con la seguente modalità:



Come si può notare dall' equazione, il processo di azotofissazione comporta un notevole consumo energetico in termini di ATP.

Il ciclo vitale di tutte le specie di rizobi include stadi differenti: vita nel suolo come saprofita, simbiote e per finire endofita nei noduli della pianta ospite (Wang et al., 2019).

### A.3 Il DNA dei batteri nodulatori

Il DNA batterico è compattato in una struttura chiamata nucleoide, in cui il cromosoma, a doppio filamento, ha una forma circolare e non lineare come quello di tutti gli eucarioti. Il materiale genetico nei procarioti è presente anche in altre regioni oltre quella del nucleoide, ad esempio nei plasmidi. Lo studio del genoma batterico è per questo più complesso rispetto a quello degli eucarioti (Wang et al., 2019).

Tutte le molecole di DNA del genoma batterico posseggono una singola origine di replicazione, per cui ogni replicone (Harrison et al., 2010) viene inteso come una singola molecola di DNA del genoma batterico. La particolare organizzazione di tale genoma fa sì che ci si possa riferire ad esso come genoma multipartito (diCenzo & Finan, 2017). L'organizzazione multipartita del genoma batterico pare essere sovraespressa nei rizobi rispetto a quanto non lo sia negli altri batteri. Inoltre, è evidente che per genomi maggiori, in termini di paia di basi (bp), la multipartizione del genoma è inferiore rispetto a quanto non lo sia per genomi inferiori, come dimostrato ampiamente in Delgado-Baquerizo et al. (2018). Ad oggi, il genoma per i rizobi con la taglia maggiore è stata riscontrata in *B. diazoefficiens* NK6 (10.4Mb) e il minore in *Rhizobium sp.* NT-26 (4.58 Mb).

In un genoma multipartito, il replicone singolo o quello maggiore viene definito cromosoma. Sul cromosoma sono localizzati i geni informativi, come quelle codificanti per i geni rRNA e i geni housekeeping. Oltre al cromosoma, riscontriamo la presenza di cromosomi secondari, cromidi, megaplasmidi (intorno alle 350 kb) e plasmidi (diCenzo & Finan, 2017).

Con i termini cromosoma secondario e cromide si indica un replicone secondario, che ospita geni essenziali, mentre questi risultano essere assenti sui megaplasmidi e i plasmidi. Benché tra  $\alpha$  e  $\beta$  rizobi vi sia una notevole diversità, la maggior parte dei rizobi possiede un gruppo di geni chiave per la simbiosi (*nod*, *nif* e *fix*) localizzati all'interno di "un'isola di simbiosi" nel cromosoma o nel plasmide (Sullivan & Ronson, 1998).

Questi geni sono coinvolti nei processi di nodulazione e fissazione dell'azoto durante la simbiosi con i legumi ad essi compatibili. L'eliminazione dei geni chiave della nodulazione, di solito porta a una completa perdita della capacità simbiotica (Marvel et al., 1985). Inoltre, le isole di simbiosi hanno un contenuto in GC inferiore rispetto al cromosoma, in un genoma rizobiale multipartito. Un'altra caratteristica notevole delle isole di simbiosi è l'arricchimento delle sequenze di inserzione (IS)

rispetto al cromosoma, in particolare quelle ad alta copia (Sullivan & Ronson, 1998). Degno di nota è che le isole di simbiosi non sono essenziali per lo stadio di vita libera dei rizobi, come dimostrato sperimentalmente in *S. meliloti* De Lajudie et al. 1994 (diCenzo et al. 2014, 2018). Infatti, la maggior parte dei geni sul plasmide di simbiosi, in diversi rizobi, sono specificamente indotti durante la nodulazione e la fissazione dell'azoto, ma non in condizioni di vita libera, quindi, prive di un ospite compatibile o del suo segnale molecolare simbiotico (Ampe et al., 2003; Capela et al., 2006).

Più di 20 anni fa è stato dimostrato che l'isola di simbiosi può essere trasferita ad altri batteri nodulatori tramite trasferimento orizzontale, come dimostrato per *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al. 1997) (Sullivan & Ronson 1998, Hubber et al., 2004). Recentemente, sono state fornite prove sul fatto che l'isola di simbiosi di *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al. 1988) è un elemento integrativo e coniugativo, che può essere trasferito a un sito specifico in un gene gly-tRNA di altri generi rizobi (Ling et al. 2016). Inoltre, la frequenza del fenomeno di trasferimento orizzontale di questa isola di simbiosi è aumentata nella rizosfera delle leguminose o in presenza di flavonoidi vegetali (Ling et al. 2016), evidenziando un intrigante scenario evolutivo ospite-dipendente dei rizobi. È interessante notare che, lo stesso plasmide di simbiosi, può essere soggetto a trasferimento coniugativo, come dimostrato in *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Danino et al. 2003; Perez-Mendoza et al. 2004, 2005). Ciò è in linea con la scoperta che plasmidi di simbiosi estremamente simili sono stati trovati in diverse specie di *Rhizobium* associate a *Phaseolus vulgaris* L. (Pérez Carrascal et al., 2016).

### **A.3.1 Il gene 16S rRNA**

Il gene 16S rRNA codifica per la componente dell'RNA della subunità 30S del ribosoma procariotico (SSU rRNA), che si lega alla sequenza Shine-Dalgarno e fornisce la maggior parte della struttura SSU (Wang et al., 2019). Il gene è costituito da circa 1500 bp, comprende nove regioni variabili sparse in tutta la sequenza altamente conservata (Woese & Fox, 1977). Questo è il marcatore genetico più comunemente utilizzato per studiare la filogenesi e la tassonomia batterica. I motivi sono essenzialmente due: (1) la sua presenza in quasi tutti i batteri, spesso esistenti come una famiglia multigenica, o operoni; (2) la funzione del gene 16S rRNA nel tempo non è cambiata, il che suggerisce che i cambiamenti casuali della sequenza sono una misura accurata del trascorrere del tempo (evoluzione) (Johnson et al.,

2019). Attualmente, due sequenze vengono attribuite alla stessa specie se vi è il 97% di similarità (Vandamme et al., 1996).

### **A.3.2 Il gene *nodC***

Il gene *nodC* è localizzato sull'operone *nodABC* che codifica per le proteine richieste nella sintesi delle strutture basali dei lipochitooligosaccaridi (LCS) (Long et al., 1996). La sintesi di tali composti viene indotta nei batteri a seguito della secrezione e del rilascio nel terreno di flavonoidi da parte delle leguminose. L'operone *nodABC* subisce diverse sostituzioni a livello della sequenza di DNA, le quali rendono possibile un certo livello di specificità simbiotica (Long, 1996). Di norma, leguminose specifiche preferiscono come loro partner simbiotici, batteri con sequenze *nodC* specifiche (*symbiovar*) (Estrella et al., 2009).

Il gene *nodC* codifica per la N-acetilglucosaminitransferasi, coinvolta nella sintesi dello scheletro dell'oligosaccaride glucosamina. Inoltre, se da un lato tale gene risulta essere ubiquitario in tutti i rizobi, fatta eccezione che per alcuni ceppi di *Bradyrhizobium* (Giraud et al., 2007), dall'altro si riscontrano sostituzioni nella sequenza genica che rispecchiano la specificità della simbiosi. Queste caratteristiche consentono di definire tale gene come il golden standard nello studio delle posizioni filogenetiche e della diversità genetica dei rizobi (Wang et al., 2019). Tale gene può essere conservato sul cromosoma o sui plasmidi; molti studi evidenziano fenomeni di trasferimento laterale tra differenti generi e specie di rizobi: sequenze altamente simili del gene in questione vengono riscontrate in rizobi di generi e specie differenti (Estrella et al., 2009). Inoltre, non sono rari i casi in cui si riscontra che la stessa specie di leguminosa faccia simbiosi con differenti *symbiovar* di rizobi, come, ad esempio, è stato descritto per *Glycine max* (L.) Merri. in Wu et al. (2011).

### **A.3.3 Il gene *nifH***

Il gene *nifH* è solitamente localizzato sull'operone *nifHDK* che codifica per alcuni dei costituenti essenziali della dinitrogenasi riduttasi, anche se l'organizzazione e la localizzazione dei geni *nif* sono specie-specifiche (Fischer, 1994). Tale gene codifica per la dinitrogenasi riduttasi (proteina-Fe), coinvolta nello scambio di elettroni durante i processi di turnover e nella maturazione dell'apodinitrogenasi.

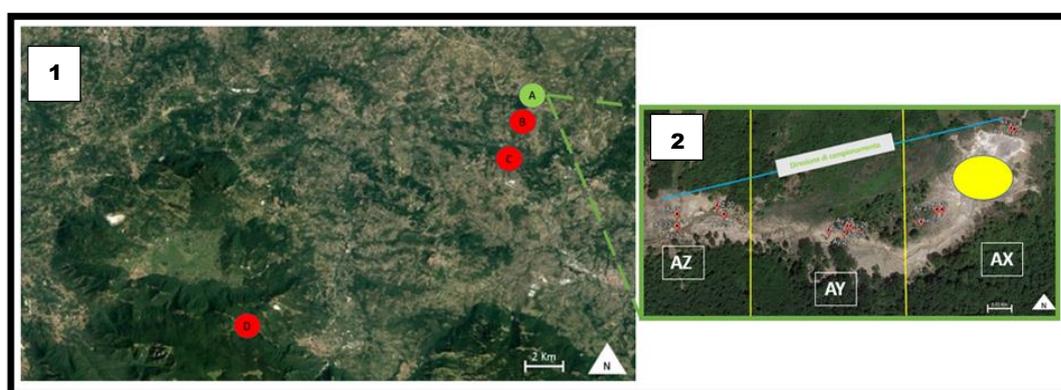
Tutti i geni coinvolti nei processi di azotofissazione (geni *nif*) possono più o meno essere co-trasferiti insieme ai geni per la nodulazione (geni *nod*) tra i diversi

rhizobia (Hubber et al., 2004), ma la loro storia evolutiva è dissociata. In Dos Santos et al. (2012) si evidenzia che i geni deputati all'azotofissazione si riscontrano tra gli Archaea e i Bacteria, mentre la funzione di nodulazione è limitata agli Alphaproteobacteria e ai Betaproteobacteria: la funzione dell'azotofissazione è anteriore a quella di nodulazione. Anche il gene *nifH*, come *nodC*, viene utilizzato come golden standard nello studio della filogenesi e della diversità genetica dei rizobi per gli stessi principi riportati per *nodC* (vedi paragrafo: Il gene *nodC*).

## A4. MATERIALI E METODI

### A.4.1 Campionamento

Per condurre uno studio comparativo tra i ceppi batterici isolati da individui di *Genista tinctoria* delle Mefite e *G. tinctoria*, oltre alla stazione delle Mefite (A, Fig. A1 – cerchio verde), sono state scelte altre tre stazioni di *G. tinctoria* da cui prelevare i noduli radicali, che sono: S. Felicita, Torella e Monte Terminio (rispettivamente B, C e D, Fig. A1 – cerchio rosso). Queste tre stazioni risultano essere distanti dalla stazione di Mefite rispettivamente 600 m, 4 km e 25 km. Il campionamento è stato condotto in un'unica campagna, nell'Ottobre 2020.



**Figura A1:** (1) Mappa delle stazioni in cui sono stati campionati i noduli di *Genista tinctoria* delle Mefite (A-verde) e di *G. tinctoria* (B, C, D-rosso); in (2) particolare della stazione delle Mefite in cui il campionamento è stato suddiviso in tre zone differenti (AX, AY ed AZ), che vanno via via ad allontanarsi dalla zona di massima emissione di gas endogeni (cerchio giallo). Il campionamento è stato condotto a partire dalla sottostazione AX a quella AZ.

Dopo aver identificato piante sane e relativamente giovani, sono stati prelevati con cura i noduli radicali (5-10 noduli per ciascun individuo) e conservati in un'unica provetta. Sono stati campionati noduli da 33 individui: 16 individui appartenenti ad individui di *G. tinctoria* delle Mefite (A) e 17 al *G. tinctoria* [rispettivamente: 5 dalla stazione di S. Felicita (B), 7 dalla stazione di Torella (C) e 5 dalla stazione di Monte Terminio (D)] (Fig. A1, Tab. A1). Per quel che riguarda la stazione delle Mefite, il campionamento è stato effettuato in tre aree (AX, AY e AZ, Fig. A1) definite in base alla distanza dalla zona di massimo addensamento di gas che viene riportato con un simbolo giallo nella Figura A1.

In laboratorio, alle provette contenenti i noduli radicali campionati sono stati aggiunti del cotone idrofilo e gel di silice per evitare un eventuale fenomeno di marcescenza. I campioni così preparati sono stati inviati presso il laboratorio del Prof. Michał Kalita, dell'Università Marie Curie (Lublino, Polonia) per eseguire l'isolamento dei ceppi batterici e l'estrazione del loro DNA genomico. Successivamente, il DNA

batterico ottenuto è stato rinviato presso il laboratorio della Prof. Olga De Castro per eseguire le analisi di amplificazione e sequenziamento dei marcatori molecolari del gene ribosomale *16S* e dei geni nodulatori e per l'azotofissazione (*nifH* e *nodC*, rispettivamente).

#### **A.4.2 Isolamento delle colonie batteriche ed estrazione del DNA**

Per motivi di emergenza Covid, questa parte dell'esperimento è stato eseguito presso il laboratorio direttamente del Prof. Kalita e suoi collaboratori.

I singoli noduli sono stati frantumati in una soluzione salina sterile e la sospensione è stata strisciata su piastre di estratto di lievito-mannitolo (YEM) agarizzate e incubata per 3-10 giorni a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le piastre sono state controllate giornalmente e le singole colonie sviluppatesi, sono state inoculate in nuove piastre YEM. I ceppi batterici così isolati sono stati inoculati in slant di terreno YEM agarizzato per garantirne la conservazione *in vivo*. Gli stessi ceppi sono stati crioconservati a  $-70^\circ\text{C}$  in glicerolo al 15%.

L'estrazione del DNA è stata eseguita seguendo il protocollo di Pitcher et al. (1989). Il protocollo prevede l'utilizzo di un potente denaturante di proteine: la guanidina tiocianata, usata per rompere le pareti cellulari di Gram positivi e negativi. I DNA sono stati stimati tramite un NanoDrop per valutarne la purezza ed inviati al laboratorio della Prof. Olga De Castro per il proseguimento delle analisi molecolari. I campioni genomici sono stati quindi rianalizzati per determinarne la concentrazione, confrontando 4  $\mu\text{l}$  di DNA estratto con uno standard di DNA (GeneRuler Express DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) attraverso un gel di agarosio all'1% contenente SafeView Nucleic Acid Stain (Applied Biological Materials Inc, ABM) ed utilizzando UVIdoc HD5 (UVITEC), come sistema di visualizzazione, acquisizione e quantificazione delle corse. Una stima aggiuntiva di maggior precisione è stata anche eseguita attraverso una quantificazione fluorimetrica usando come strumento un Qubit 3 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

#### A.4.3 Amplificazione e sequenziamento dei geni *16S* rRNA, *nodC* e *nifH*

In questo studio sono stati impiegati tre marcatori molecolari: il gene *16S* rRNA per il riconoscimento dei ceppi batterici isolati, ed i geni *nodC* e *nifH* per riconoscere eventuali *symbiovar* presenti nello studio.

Il gene *16S* rRNA è stato amplificato con la seguente coppia di primers **fd1**: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e **rd1**: 5'-CTT AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' (Weinsburg et al., 1990). Questi primer hanno dimostrato avere bassa efficienza di amplificazione per alcuni campioni e per tale motivo sono stati utilizzati altri due coppie di primer: **fd1d**: 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG A-3' e **rPla**: 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3' (Parker, 1999). Per i ceppi appartenenti al genere *Bradyrhizobium* sono stati analizzati anche i marcatori *nodC* e *nifH*. Il gene *nodC* è stato amplificato con i primer: **NodCfor540** TGA TYG AYA TGG ART AYT GGC T e **NodCrev1160** CGY GAC ARC CAR TCG CTR TTG (Sarita et al., 2005), mentre il gene *nifH* è stato amplificato con i primer descritti in Vinuesa et al. (2005; **nifH40F**: GGN ATC GGC AAG TCS ACS AC e **nifH817R**: TCR AMC AGC ATG TCC TCS AGC TC).

Le PCR sono state eseguite utilizzando:

- 10 ng di DNA genomico,
- 0,25 µM di ciascun primer,
- Kodaq 2X PCR MasterMix (Applied Biological Materials, ABM).

Le reazioni PCR sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore della DNA polimerasi, con una TA di 55°C per tutti i marcatori.

Gli ampliconi ottenuti sono stati purificati utilizzando la precipitazione PEG-8000 (PEG 15%, NaCl 2,5 M) e sono stati sequenziati utilizzando coloranti fluorescenti (Bright Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ICloning). Le quantità di purificato stampo e primer da utilizzare nella reazione di sequenziamento sono state calcolate conformemente a quanto riportato nelle istruzioni del produttore. Le reazioni sono state purificate, utilizzando il kit di purificazione BigDye XTerminator (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), e lette utilizzando un sequenziatore automatico (3130 Genetic Analyzer, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). I dati grezzi ottenuti sono stati analizzati utilizzando AB DNA Sequencing Analysis ver. 5.2 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e le sequenze ottenute sono

state assemblate ed allineate con il software Chromas Pro ver. 2.1.8. (Technelysium Pty Ltd). Successivamente, un'analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. 1990) è stata eseguita per valutare possibili identità di sequenza con i taxa depositati in banca dati.

#### **A.4.3.1      Analisi dei dati**

Con le sequenze ottenute sono state condotte analisi filogenetiche con l'ausilio del software MEGA ver. 10.2.5 (Kumar et al., 2018).

Per ricostruire i rapporti filogenetici tra i vari ceppi batterici isolati e valutare un eventuale correlazione taxon-specifica con i siti di campionamento, è stata eseguita un'analisi preliminare di Massima Verosomiglianza (Maximum Likelihood, ML) usando i vari marcatori in modo indipendente (ossia non concatenandoli in una unica matrice). L'analisi della massima probabilità, condotta con un bootstrap di 1.000 repliche consiste nel massimizzare la funzione di verosomiglianza, definita in base alla probabilità di osservare una data realizzazione campionaria, condizionatamente ai parametri oggetto di stima (Edwards 1972).

Per valutare il miglior modello di sostituzione nucleotidica per ogni marcatore, si è usato il software jModelTest ver. 2.1.10 (Darriba et al., 2012) che permette di saggiare l'allineamento della matrice delle sequenze con 1624 modelli diversi per ciascuna regione nucleotidica. Per ogni marcatore sono stati calcolati i valori degli indici di Akaike Information Criterion (AIC) e Bayesian Information Criterion (BIC), così da valutare la bontà dei modelli analizzati dal software. Il programma indica, quindi, il modello di sostituzione più adatto sulla base dei dati creando una lista di tutti i risultati ottenuti per tutti gli altri modelli, i quali vengono elencati in ordine decrescente di efficienza.

## A.5 Risultati e discussione

La caratterizzazione molecolare dei ceppi di batteri simbiotici azotofissatori, presenti nei noduli radicali di *Genista tinctoria* delle Mefite e di *G. tinctoria*, evidenzia la presenza di nodulatori appartenenti al genere *Bradyrhizobium*, come riportato in letteratura (Kalita & Malek, 2004) e la presenza di alcuni batteri Gram positivi ascrivibili al genere *Micromonospora* (Martinez-Hidalgo et al., 2014) (Tab. A1). Dai risultati derivanti dalla ricostruzione dei rapporti filogenetici per il marcatore del gene ribosomiale *16S* (dati non mostrati), esistono chiaramente due linee di batteri simbiotici separate, e cioè, i ceppi batterici isolati presso le stazioni di Mefite (cod. A, isolati da individui di *G. tinctoria* delle Mefite, Tab. A1), S. Felicita e Torella (cod. B e C, isolati da individui di *G. tinctoria*, Tab. A1) rientrano nel raggruppamento di *Bradyrhizobium elkanii*, mentre i ceppi isolati dal Monte Terminio (cod. D, *G. tinctoria*, Tab. A1) appartengono al gruppo di *B. japonicum* (dati non mostrati).

L'analisi del marcatore *nodC* mette in luce la presenza di due symbiovar (sv.) differenti nei ceppi isolati presso il Monte Terminio (cod. D, *G. tinctoria*): i ceppi E13.3 ed E14C1 (Tab. A1) appartengono al sv. *retame*, mentre i ceppi E12D2 ed E16D1 (Tab. A1) a quello *genistarum*. Inoltre, i ceppi batterici isolati presso le stazioni di Mefite (cod. A, *G. tinctoria* delle Mefite), S. Felicita e Torella (cod. B, C- isolati da individui di *G. tinctoria*) fanno parte tutti del symbiovar *retame* (dati non mostrati).

L'analisi del gene di azotofissazione *nifH* conferma che i ceppi isolati dalle stazioni di Mefite (cod. A, – isolati da individui di *G. tinctoria* delle Mefite), S. Felicita e Torella (cod. B e C, isolati da individui di *G. tinctoria*) sono geneticamente simili, ma non abbiamo informazioni sufficienti sui ceppi isolati dal Monte Terminio (cod. D), in quanto i campioni hanno presentato una bassa efficienza di amplificazione. Inoltre, al momento, non sono presenti dati che supportano una variabilità tra i ceppi batterici isolati da individui di *G. tinctoria* delle Mefite e *G. tinctoria* (dati non mostrati).

I dati raccolti per il genere *Bradyrhizobium* e relativi ai marcatori molecolari *16SrRNA*, *nodC* e *nifH* (dato non mostrato), al momento, non evidenziano differenze tra i ceppi batterici isolati dai noduli radicali di *G. tinctoria* delle Mefite e di *G. tinctoria*. Nello specifico, è da sottolineare il dato estrapolato dalle analisi per il gene nodulatore *nodC*: gli isolati della stazione del Monte Terminio

appartengono a due symbiovar differenti, questo potrebbe essere spiegato con un possibile trasferimento laterale dell'operone *nodABC* tra specie differenti, come ampiamente dimostrato per batteri nodulatori di altre specie di leguminose (Wu et al., 2011.). Queste restano, al momento, ancora indagini preliminari che devono essere arricchite da un numero di indagini maggiori, come l'amplificazione di ceppi

<b>Tabella A1:</b> campionamento di noduli radicali da individui <i>Genista tinctoria</i> delle Mefite e <i>G. di G. tinctoria</i> e risultati della classificazione dei ceppi mediante l'utilizzo del marcatore universale <i>16S rRNA</i> .						
Popolazione	N.C.	N.C.V.	Ceppi isolati			
			Non identificato	<i>Micromonospora</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	Altro
<b>Mefite (A)</b>	16	12	(13) AY24C2, AY24D1, AY25F2, AY25B1, AY26.1, AY27B2, AZ29A2, AZ29A3, AZ30A1, AZ30B1, AZ30C1, AZ30D1, AZ32A1.	(13) AX23A1, AY24B1, AY24B2, AY24B4, AY27B1, AY27C3, AY27E1, AY28C2, AZ29A4.1, AZ31.2, AZ32C1, AZ32E3, AZ32F1.	(20) AX21A1, AX23A2, AY24F2, AY24E1, AY25E1, AY25C1, AY25B2, AY26II.1, AY26A1, AY26D1, AY27F1, AY27C2, AY28D1, AY28B2, AZ29A4, AZ29C1, AZ30C2, AZ32C2, AZ32E1, AZ33E2.	(7) AY24B3, AY25B3, AY25F1, AY26A1.1, AY26.2, AZ33J2, AZ31.1.
<b>Santa Felicità (B)</b>	5	4	(15) C1.1, C1A1, C1B1, C1G1, C1G2, C2D1, C2D2, C2B2, C2B3, C4.7, C4E3, C4D1, C4D2, C4F1, C4.1.	(8) C1A2, C1H2, C1H3, C1F1, C4.3, C4C1, C4C3, C4F3.	(2) C1D1, C4.6.	(3) C2E1, C4D4, C5A2.
<b>Torella (C)</b>	7	4	(5) D7.1, D10B1, D12D1, D12D2, D12D4.	(5) D10B3, D10C3, D11E1, D11E3, D12D4.	(2) D7B1, D12D5.	(3) D10B2, D10C1, D12E1.
<b>Monte Terminio (D)</b>	5	5	(10) E13.2, E15A1, E15C1, E15D1, E15A2, E16A1, E16B2, E16E2, E17C1, E17A1.	NESSUNO.	(5) E13.3, E14C1, E15D2, E16D1, E17E1.	NESSUNO.
N.C.: numero di individui da cui sono stati campionati noduli radicali; N.C.V.: numero di individui che hanno prodotto ceppi vitali.						

non ancora isolati, il prelievo di un numero maggiore di noduli e l'ottimizzazione delle reazioni di amplificazione per il gene *nifH* la cui analisi si è mostrata più ostica.

## BIBLIOGRAFIA.

- Ampe F., Kiss E., Sabourdy F., Batut J. 2003.** Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* 4: R15.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Appunu C., N'Zoe A., Laguerre G. 2008.** Genetic diversity of native *Bradyrhizobia* isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(19): 5991-5996.
- Cao Y., Wang E.T., Zhao L., Chena W.M., Weia G.H. 2014.** Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biol. Biochem.* 78: 128-137.
- Capela D., Filipe C., Bobik C., Batut J., Bruand C. 2006.** *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with Alfalfa: A Transcriptomic Dissection. *APS.* 19(4): 363-372.
- Danino V.E., Wilkinson A., Edwards A., Downie J.A. 2003.** Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol. Microbiol.* 50(2): 511-525.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods.* 9: 772.
- diCenzo G.C., Finan T.M. 2017.** The divided bacterial genome: structure, function and evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81(3): e00019-17.
- diCenzo G.C., MacLean A.M., Milunovic B., Golding G.B., Finan T.M. 2014.** Examination of Prokaryotic Multipartite Genome Evolution through Experimental Genome Reduction. *PLoS Genet.* 10(10): e1004742.
- diCenzo G.C., Benedict A.B., Fondi M., Walker G.C., Finan T.M., Mengoni A., Griffiths J. S. 2018.** Robustness encoded across essential and accessory replicons of the ecologically versatile bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *PLoS Genet.* 14(4): e1007357.
- Delgado-Baquerizo M., Oliveriotess A.M., Benavent-Gonzàles E.B., Eldrige D.J., Bardgett R.D., Fernando B., Maestre T., Singh B.K, Fierer N. 2018.** A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science.* 359(6373):320-325.
- Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W. Setubal J.C., Dixon R. 2012.** Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics.* 13: 162.
- Edwards A. 1972.** Likelihood: an account of the statistical concept of likelihood and its application to scientific inference. *Math. Gaz.* 57: 357-359.

- Estrella M.J., Muñoz S., Soto M.S., Ruiz O., Sanjuán J. 2009.** Genetic diversity and host range of Rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl. Environ. Microbiol.* 74(4): 1088-1098.
- Fischer H.M. 1994.** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Reviews.* 59(3): 352-386.
- Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. 1932.** Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: University of Wisconsin Press.
- Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaux F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Saunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Verméglio A., Médigue C., Sadowsky M. 2007.** Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic Bradyrhizobia. *Science.* 316(5829): 1307-1312.
- Han L.L., Wang E.T., Han T.X., Liu J., Sui X.H., Chen W.F., Chen W.X. 2009.** Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil.* 324: 291–305.
- Harrison P.W., Lower R.P.J., Kim N.K.D., Young J.P.W. 2010.** Introducing the bacterial ‘chromid’: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18(4):141-148.
- Hoffman B.M., Lukoyanov D., Yang Z. Y., Dean D.R., Seefeldt L.C. 2014.** Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem. Reviews.* 114(8): 4041-4062.
- Hubber A., Vergunst A.C., Sullivan J.T., Hooykaas P.J.J., Ronson C.W. 2004.** Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 54(2): 561-574.
- Johnson J.S, Spakowicz D.J., Bo-Young Hong B.Y, Petersen L.M., Demkowicz P., Chen L., Leopold S.R., Blake M. Hanson B.M., Agresta H.O., Gerstein M., Sodergren E., Weinstock G.M. 2019.** Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications.* 10: 5029.
- Kalita M., Malek W. 2004.** Phenotypic and genomic characteristics of Rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(6):707-715.
- Kalita M., Malek W. 2010.** *Genista tinctoria* microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. Genistearum. *Syst. Appl. Microbiol.* 33(5): 252-259.
- Kalita M., Malek W. 2017.** Molecular phylogeny of *Bradyrhizobium* bacteria isolated from root nodules of tribe Genisteae plants growing in southeast Poland. *Syst. Appl. Microbiol.* 40(8): 482-491.

- Kalita M., Malek W. 2020.** Root nodules of *Genista germanica* harbor *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* bacteria exchanging *nodC* and *nodZ* genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 43 (1): 126026.
- Kalita M., Stępkowski T., Lotocka B., Malek W. 2006.** Phylogeny of nodulation genes and symbiotic properties of *Genista tinctoria* bradyrhizobia. *Arch Microbiol.* 186:87–97.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Ling J., Wang H., Wu P., Li T., Tang Y., Naseer N., Zheng H., Masson-Boivin C., Zhong H., Zhu J. 2016.** Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *PNAS.* 113(48): 13875-13880.
- Lloret L., Martínez-Romero E. 2005.** Evolución y filogenia de rhizobia. *Microbiología.* 47 (1-2).
- Long S.R.1996.** *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell.* 8(10): 1885-1898.
- Man C.X., Wang H., Chen W.F., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X. 2008.** Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant Soil.* 310: 77-87.
- Martinez-Hidalgo P., Flores-Felix J.D., Velázquez E., Brau L., Trujillo M.E., Martinez- Molina E. 2019.** High taxonomic diversity of *Micromonospora* strains isolated from *Medicago sativa* nodules in Western Spain and Australia. *Syst. Appl. Microbiol.* 43: 1.
- Martinez-Hidalgo P. Galindo-Villardón P., Trujillo M.E., Igual J.M., Martine-Molina E., 2014.** *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Sci. Rep.* 4: 6389.
- Marvel D. J., Kuldau G., Hirsch A., Richards E., Torrey J. G., Ausubel F. M. 1985.** Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a nonlegume host. *PNAS.* 82(17): 5841-5845.
- Mnasri B., Saïdi S., Chihaoui S.A., Mhamdi R. 2012.** *Sinorhizobium americanum* symbiovar mediterraneanense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Syst. Appl. Microbiol.* 35 (4): 263-269.
- Parker M.A. 1999.** Relationships of *Bradyrhizobia* from the Legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 4914-4920.

- Patriarca E.J., Taté R., Iaccarino M. 2002.** Key role of bacterial NH<sub>4</sub> metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 203-222.
- Pérez Carrascal O.M., Van Insberghe D., Juárez S., Polz M.F., Vinuesa P., González V. 2016.** Population genomics of the symbiotic plasmids of sympatric nitrogen-fixing *Rhizobium* species associated with *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Microbiol.* 18(8): 2660-2676.
- Pérez-Mendoza D., Domínguez-Ferrerías A., Muñoz S., Soto M.J., Olivares J., Brom S., Girard L., Herrera-Cervera J.A., Sanjuán J. 2004.** Identification of functional mob regions in *Rhizobium etli*: evidence for self-transmissibility of the symbiotic plasmid pRetCFN42d. *Plant Microbiol.* 186(17): 5753-5761.
- Pérez-Mendoza D., Sepúlveda E., Pando V., Muñoz S., Nogales J., Olivares J., Soto M.J., Herrera-Cervera J.A., Romero D., Brom S., Sanjuán J. 2005.** Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transfer of rhizobial symbiotic megaplasmids. *ASM.* 187(21): 7341-7350.
- Pitcher D.G., Saunders N.A., Owen R.J. 1989.** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151-156.
- Pool P., Allaway D. 2000.** Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* 43: 117-163.
- Román-Ponce B., Zhang Y.J., Sui X.H., Chen W.F., Padilla J.C.A., Guo X.W., Gao J.L., Yan J., Wei G.H., Wang E.T. 2015.** *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *International J. Syst. Evol. Microbiol.* 00: 1-9.
- Sarita S., Sharma P.K., Priefer U.B., Prel J. 2005.** Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54(1): 1-11.
- Shiraishi A., Matsushita N., Hougetsu T. 2010.** Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst. Appl. Microbiol.* 33(5): 269-274.
- Silva C., Vinuesa P., Eguiarte E., Martínez-Romero E., Souza V. 2020.** *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed Milpa Plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2): 884-893.
- Sullivan J.T., Ronson C.W. 1998.** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(9):5145-5149.
- Tamimi S.M., Young J.P.W. 2004.** *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. *Appl. Soil Ecol.* 26(3): 193-200.

**Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Reviews.* 60(2): 407-438.

**Verástegui-Valdés M.M., Zhang Y.J, Rivera-Orduña F.N., Cheng H.P., Sui X.H. Wang E.T. 2014.** Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 37(8): 605-612.

**Vinuesa P., Silva C., Werner D., Martínez-Romero E. 2005.** Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34(1): 29-54.

**Wang E.T., Chen W.F., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. 2019.** Ecology and evolution of Rhizobia. Springer. Singapore.

**Weinsburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1990.** 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.

**Woese C.R., Fox G.E. 1977.** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Evolution.* 74(11): 5088-5090.

**Wu L. J., Wang H.Q., Wang E.T., Chen W.X., Tian C.F. 2011.** Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76(3): 439-450.

## ELENCO PUBBLICAZIONI

-**Di Iorio, E.**, De Castro, O., Innangi, M., Santangelo, A., Strumia, S. In revisione. Extreme environments as evolution drivers: the cold case of *Genista anxantica* vs *G. tinctoria* in the Mefite of the Ansanto Valley (southern Italy). Botanical Journal of the Linnean Society.

-Menale, B., De Castro, O., **Di Iorio, E.**, Ranaldi, M., Muoio, R. 2021. Discovering the ethnobotanical traditions of the island of Procida (Campania, southern Italy). Plant Biosystems, 0: 1-19.

-De Castro O., Del Guacchio E., **Di Iorio E.**, Di Maio A., Di Martino L., Bartolucci F., Conti F. 2020. Barcoding helps threatened species: the case of *Iris marsica* (Iridaceae) from the protected areas of the Abruzzo (central Italy). Plant Biosystems. 6: 961-972.