

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche



Tesi di Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata

(Sistematica Molecolare)

**Filogenesi molecolare del genere *Cirsium* Mill.
sect. *Eriolepis* (Cass.) Dumort.**

XXIV ciclo

Relatore

Candidata

Chiar. mo Prof.

Carucci Francesca

Paolo Caputo

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	3
Famiglia <i>Asteraceae</i>	3
Tribù <i>Cardueae</i>	11
Genere <i>Cirsium</i>	13
Sezione <i>Eriolepis</i>	17
SCOPO DEL LAVORO	19
Variabilità ed evoluzione del genoma	21
Il fenomeno dell'ibridazione	23
Sistematica classica e filogenesi molecolare	26
Gli alberi filogenetici	28
L'analisi cladistica	30
La massima parsimonia	32
L'analisi bayesiana	34
I MARCATORI MOLECOLARI	35
Il genoma nucleare: gli ITS	39
Gli ETS	42
Il genoma plastidiale	44
Spaziatore intergenico <i>psbA-trnH</i>	48
Introne <i>rps16</i>	49
Spaziatore intergenico <i>trnC-ycf6</i>	50
TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE UTILIZZATE	52
Elettroforesi	52
PCR	55

Clonaggio	58
Sequenziamento	60
MATERIALI E METODI	62
Specie studiate e loro distribuzione	62
Campionamento	64
Estrazione del DNA	64
Amplificazione di marcatori multicopia	66
Clonaggio dei prodotti di PCR	68
Purificazione delle bande	71
Reazioni di sequenza	72
Analisi delle sequenze	73
Elenco delle sigle	76
Soluzioni stock	76
RISULTATI	78
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	100
BIBLIOGRAFIA	107
APPENDICE	131

INTRODUZIONE

Le Asteraceae

Le *Asteraceae* (Martynov, 1820), conosciute anche come *Compositae* (Giseke, 1792), appartenenti all'ordine delle *Asterales* Lindl. (Lindley, 1833), tribù *Cynareae* (Lam & DC.), rappresentano una delle famiglie di Angiosperme con il maggior numero di specie ad oggi descritte ed accettate (circa 24.000), ma con una stima approssimativa di più di 30.000 specie esistenti (Funk *et al.*, 2009), raggruppate in 1600-1700 generi (Bremer, 1994) (Fig.1).



Fig. 1 Rappresentanti della famiglia delle *Asteraceae*

Tale abbondanza in specie rende la famiglia rappresentante di circa l'8% di tutte le piante a fiore esistenti (Stevens, 2001) e fornisce una buona opportunità per capire l'adattamento su scala globale di un gruppo a radiazione evolutiva recente (Panero & Funk, 2008).

La chimica dei composti secondari, la morfologia dell'infiorescenza e la plasticità dell'habitus delle *Asteraceae* sono tutte caratteristiche considerate responsabili del successo evolutivo della famiglia (Carlquist, 1976) così come la diffusa poliploidia risulta associata ad un incremento del tasso di speciazione (Vamosi & Dickinson, 2006).

La notevole diversificazione morfologica delle specie appartenenti a questa famiglia ed una distribuzione pressappoco cosmopolita eccetto che in Antartide (Funk *et al.*, 2009) sono tali che non ci si sorprende nello scoprire che già in epoca antica autori come Teofrasto (ca. 371 a 287 a.C.) si siano interessati della storia naturale del gruppo (Greene, 1983).

Nella prima metà del XVI secolo il botanico francese Jean Ruel (1474-1537) avanzò molte osservazioni originali e introdusse un gran numero di nuove terminologie morfologiche riguardanti il gruppo; tuttavia un notevole contributo nell'analisi sistematica delle *Compositae* si ebbe solo nel XVII secolo con il lavoro di tre illustri studiosi: Joseph Pitton de Tournefort, Sebastien Vaillant e Johann Le Francq van Berkhey (Bonifacino *et al.*, 2009).

Il nome della famiglia deriva dalla morfologia caratteristica dell'infiorescenza a capolino e la terminologia "Compositae" venne utilizzata per la prima volta da Michel Adanson (1727-1806), botanico francese che nel 1763 pubblicò il lavoro "Familles des Plantes" in cui descrisse diverse famiglie di piante e tra di esse una chiamata *Compositae*. Tuttavia a seguito del Seventeenth International Botanical Congress of Vienna, Austria, July 2005 (Articolo 13.1, McNeill *et al.*, 2006) la data di inizio per l'assegnazione dei nomi alle famiglie di piante fu fissata al 4 Agosto 1789, data di pubblicazione del "Genera Plantarum" di Jussieu (1789) e la paternità del nome *Compositae* fu assegnata a Giseke che lo utilizzò nel suo "Praellectiones in Ordines Naturales Plantarum" nel 1792 (Bonifacino *et al.*, 2009). Nella "Tabula genealogico-

geographica affinitatum plantarum secundum ordines naturales Linnaei", Giseke aveva già intuito la grandezza della famiglia delle *Compositae* rispetto alle altre famiglie di Angiosperme (Fig.2).

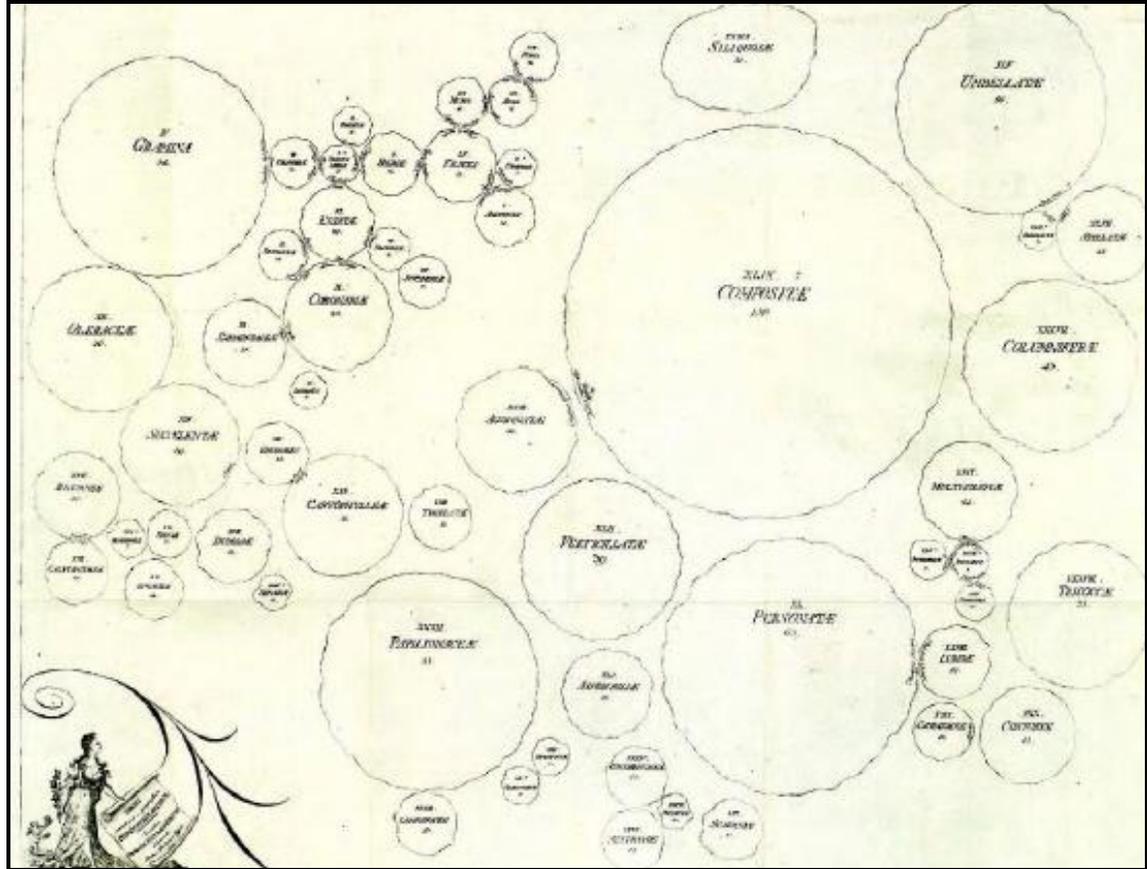


Fig.2 "Tabula genealogico-geographica affinitatum plantarum secundum ordines naturales Linnaei" di Giseke 1792 (Bonifacino *et al.*, 2009)

Analisi filogenetiche condotte nell'ultimo ventennio hanno rivelato che la famiglia delle *Asteraceae* ha avuto origine in Sud America. Le sottofamiglie *Barnadesioideae* (Bremer & Jansen, 1992) e *Stiffioideae* (D. Don) Panero (Panero, 2007), endemiche del Sud America, rappresentano le linee basali del gruppo mentre le *Mutisioideae* (Cass.) Lindley (Lindley, 1829), le *Wunderlichioideae* Panero & Funk (Panero & Funk, 2007) e le *Gochnatioideae* (Benth. & Hook.) Panero & Funk (Panero & Funk, 2002), anch'esse sudamericane, hanno dato avvio alla successiva diffusione negli altri

continenti (Panero & Funk, 2008). Ciononostante tali raggruppamenti rappresentano solo il 4% della biodiversità di specie della famiglia; il rimanente 96% si è sviluppato successivamente alla dispersione al di fuori del Sud America (Panero & Funk, 2008).

Si stima che l'origine delle *Asteraceae* sia successiva alla frammentazione del supercontinente Gondwana, tra l'Eocene (42-47 Ma) (Kim *et al.*, 2005) e il Paleocene-Selandiano ovvero 60 Ma (McKenzie *et al.*, 2006). La presenza di polline fossile risalente all'Eocene conferma la diffusione delle *Asteraceae* nell'emisfero boreale già 40 milioni di anni fa, su entrambe le coste dell'Oceano Pacifico, (Nord America-Texas: Elsik & Yancey, 2000; nord-ovest della Cina: Song *et al.*, 1999). Tali analisi sono a sostegno della teoria secondo la quale l'evoluzione delle *Asteraceae* ha avuto inizio quando il Sud America era un territorio isolato, connesso al Nord America e all'Africa da catene di isole soggette a fluttuazioni del livello del mare (Sclater *et al.*, 1977; Iturralde-Vinent & MacPhee, 1999) e la dispersione casuale delle specie è quella maggiormente accreditata per giustificarne la diffusione (Raven & Axelrod, 1974; Stuessy *et al.*, 1996). Tre sono le teorie maggiormente accreditate per giustificare la successiva diffusione delle *Compositae* al di fuori del continente americano (Panero & Funk, 2008): una teoria di diversificazione africana o eurasiatica con un primo evento di dispersione transatlantico da cui poi si sarebbero originate tutte le *Asteraceae* incluse le *Hecastocleidoideae* Panero & Funk (Panero & Funk, 2008): del Nord America; una teoria di diversificazione nordamericana a cui avrebbe fatto seguito la dispersione verso l'Eurasia e l'Africa attraverso rotte passanti per l'emisfero settentrionale; una teoria di diversificazione sudamericana con due successivi e distinti eventi di dispersione, uno verso l'Africa e l'Eurasia che avrebbe dato origine alla maggior parte delle specie di *Asteraceae* oggi

esistenti, ed un altro verso il Nord America evolutivamente meno fortunato. Tuttavia il gran numero di *Asteraceae*, derivanti da linee evolutive differenti, che oggi si ritrovano in simpatria, indicano una complessa storia biogeografica legata all'evoluzione di questa famiglia (Panero & Funk, 2008).

Sebbene le *Asteraceae* possano annoverare una lunga storia di lavoro tassonomico e più recentemente di filogenesi molecolare, non tutte le principali linee evolutive della famiglia sono state identificate, e le loro relazioni non sono ad oggi ben definite (Panero & Funk, 2008); ciononostante la famiglia risulta essere monofiletica, come dimostrato dalle tutte le analisi effettuate (ad es. Small, 1919; Bremer, 1987), pur presentando una notevole quantità di forme differenti. Essa, inoltre comprende due gruppi monofiletici di dimensioni molto differenti (Gruenstaeudl *et al.*, 2009).

Esistono *Asteraceae* annuali, biennali o perenni, ad habitus erbaceo o arbustivo e raramente arboreo. Esse, inoltre, crescono quasi in ogni tipo di ambiente, dalle foreste montane agli ambienti tropicali, anche se la maggiore distribuzione si ha negli ambienti aperti e ruderali.

Molte specie ruderali si adattano facilmente alle aree disturbate, talvolta soppiantando specie coesistenti maggiormente sensibili ai disturbi, al punto da essere considerate infestanti. Tuttavia un elevato numero di specie, soprattutto nelle regioni montane tropicali, è presente con habitat ristretti, costituendo popolazioni esigue e talvolta a rischio di estinzione.

Caratteristiche distintive per la famiglia delle *Asteraceae* sono le foglie alterne, opposte o in rosetta basale senza stipole che possono essere provviste di spine sul fusto, lungo il margine delle foglie e spesso anche all'apice delle brattee delle infiorescenze. I fiori, di regola ermafroditi, tetraciclici e pentameri, che si presentano raggruppati in un ricettacolo a sviluppo centripeto (Harris, 1995), circondati da un involucri di brattee e sepali ridotti

ad una coroncina di squame o reste, persistenti nel frutto. La corolla può presentarsi tubulosa (attinomorfa), bilabiata o ligulata (zigomorfa). Cinque stami con antere fuse a formare un tubo attorno allo stilo nel quale è rilasciato il polline; due carpelli formanti un ovario infero uniloculare. Il frutto è un achenio sormontato da un pappo persistente (Fig. 3). L'impollinazione è anemogama o entomogama. L'epoca di fioritura è ampiamente variabile nell'ambito della famiglia tuttavia il periodo di impollinazione maggiormente

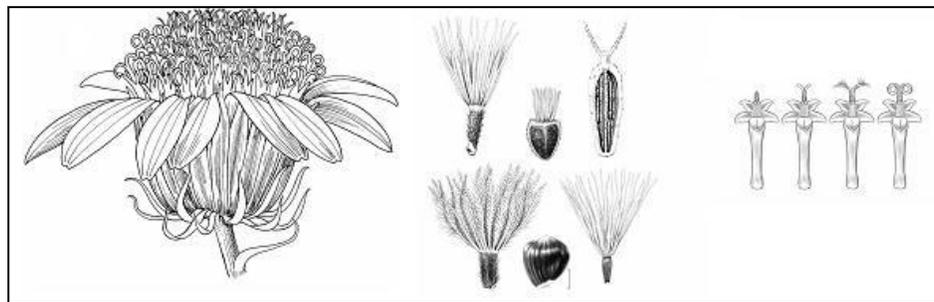


Fig.3: Caratteristiche delle *Compositae* (Harris, 1995)

significativo è la seconda parte dell'estate con apice di pollinazione compreso tra agosto e settembre.

La presenza e la disposizione dei fiori del raggio (zigomorfa o bilabiata) e del disco (attinomorfa) sul capolino ha rappresentato, fin dai primi studi pionieristici di sistematica, un carattere di distinzione delle specie (Funk *et al.*, 2009) e a tutt'oggi permette di individuare due differenti sottofamiglie: *Tubuliflorae* (*Asteroideae* e *Cynareae*) e *Liguliflorae* (*Cichorioideae*) (Pignatti, 1982) (Fig. 4).



Fig. 4: *Hieracium aurantiacum* (Liguliflorae), *Centaurea dealbata* (Tubuliflorae)

Il primo tentativo di classificare le *Compositae* venne effettuato da Cassini (1819a,b), il quale suddivise la famiglia in 20 tribù in relazione a similarità morfologiche. Successivamente Bentham (1873), indipendentemente dal lavoro di Cassini, ridimensionò il numero delle tribù a 13 e pose i concetti dapprima espressi da Cassini alla base di tutte le moderne classificazioni delle *Asteraceae* (i.e. Carlquist, 1976; Jeffrey, 1978; Bremer, 1994).

Tra il 1890 e 1894 Hoffmann riprese la classificazione di Bentham (Turner 1977; Bremer, 1994) aggiungendo la possibile derivazione delle *Asteraceae* moderne dalla più primitiva tribù delle *Heliantheae* Cass. Successivamente Robinson (1973), Carlquist (1976), Wagenitz (1976) e Jeffrey (1978) raggrupparono le tribù già esistenti in due grandi gruppi: Asteroideae e non-Asteroideae che solo Carlquist e Jeffrey chiamarono sottofamiglie delle *Cichorioideae* e delle *Asteroideae*. Tali due sottofamiglie tuttavia non corrispondevano alle attuali *Cichorioideae* ed *Asteroideae* a causa di un errore di collocazione delle *Eupatorieae* Cass. superficialmente somiglianti alle *Vernonieae* Cass. e per questo motivo ad esse associate. Anche Pignatti (1982) riprese questa classificazione suddividendo le *Compositae* nelle due sottofamiglie: *Tubuliflorae* (Asteroideae) e *Liguliflorae* (Cichorioideae). Secondo Bremer (1994), infatti, le *Asteroideae* sono caratterizzate, salvo

qualche eccezione, dalla presenza dei fiori del raggio, dai fiori del disco con lobi corti, dalla riduzione del tessuto stigmatico a due linee marginali su ciascuna delle ramificazioni dello stilo, dalla scomparsa dei laticiferi e dal tipo di polline cavo (Blackmore *et. al.*, 1984), caratteristiche raramente osservabili nelle *Cichorioideae* Panero & Crozier (Panero & Crozier, 2008). Una svolta decisiva nella sistematica delle *Asteraceae* si è avuta fra gli anni '80 e gli anni '90 con i lavori di sistematica molecolare di Jansen & Palmer (1987,1988); Jansen *et al.*, 1991a,b; Jansen & Kim, 1996, i quali hanno capovolto la sistematica classica ponendo le *Mutisieae* Cass. alla base della famiglia ed evidenziando la successiva evoluzione delle *Heliantheae*, dimostrando, inoltre, che *Vernonieae* ed *Eupatorieae* sono filogeneticamente distanti. Tali dati sono stati confermati dalle analisi di Bremer (1987) basate per lo più su dati morfologici, tranne che per le *Eupatorieae* risultate essere più vicine alle *Astereae* piuttosto che alle *Heliantheae*.

Le *Asteraceae* sono una famiglia di grande importanza anche dal punto di vista economico. E' infatti possibile riconoscere all'interno del gruppo piante ad uso medicinale come la Camomilla e l'Echinacea; piante ad uso alimentare, come la Lattuga ed il Carciofo; piante ornamentali, come la Dalia ed il Crisantemo. Al grande polimorfismo della *Compositae* corrisponde, infine, la sintesi di molti principi attivi dalle molteplici proprietà terapeutiche. Già Dioscoride (I sec. A.C.) nel “*De Materia Medica*” menziona numerose specie appartenenti alla famiglia per le notevoli proprietà medicinali ad esse attribuite.

La tribù *Cardueae*

La tribù delle *Cardueae* Cass. (Cassini, 1819) è una delle più numerose nella famiglia delle *Compositae* con le sue 2500 specie suddivise in 83 generi (Bremer, 1994); ciononostante, evidenze molecolari ne rivelano la monofilia (siti di restrizione cpDNA, Bremer & Jansen, 1991; rbcL, Kim *et al.*, 1992; DNA nucleare-ribosomale, Susanna *et al.*, 1995; analisi combinata DNA cloroplastico e ribosomale, Garcia-Jacas *et al.*, 2002; Susanna *et al.*, 2006). Ragioni di un tale successo evolutivo sembrano essere la grande capacità di dispersione dei semi, la resistenza dei semi stessi, la spinosità che allontana gli erbivori e la tolleranza alla siccità; tutte caratteristiche che spesso ne rendono i suoi rappresentanti specie infestanti (Groves & Kaye, 1989). Caratteri morfologici distintivi per le *Cardueae* sono la presenza di spine apicali sulle foglie; un involucrio bratteale suddiviso in cinque file con punte spinose; stilo cilindrico con parete ispessita al di sotto della diramazione e munito di un corto collare di peli rigidi; antere con appendici basali laciniate e filamenti dell'antera di solito papilloso; stami spesso fortemente tigmotropici che presentano un elaborato meccanismo di liberazione del polline; un achenio obconico o generalmente cilindrico spesso con pericarpo rinforzato con uno strato di sclerenchima e un solco apicale al di sotto dell'inserzione del pappo (Funk *et al.*, 2009).

Tradizionalmente le *Cardueae* vengono classificate in 4 sottotribù: *Carduinae*, *Carlininae*, *Centaureinae* e *Echinopsinae* (Bentham, 1873; Hoffman, 1894; Bremer, 1994) ma tale classificazione è estremamente controversa (Garcia-Jacas *et al.*, 2002) a causa della insoddisfacente delimitazione di ciascun gruppo.

La prima classificazione delle Asterales realizzata da Cassini (1819) comprendeva tre tribù: *Echinopeae*, *Carlineae* e *Cardueae*, quest'ultima con due sottotribù, *Carduinae* e *Centaureinae*. Successivamente Bentham (1873) e Hoffmann (1894) inclusero nell'unica tribù delle *Cardueae* due sottotribù: *Echinopsidinae* (Cass.) Dumort., *Carlininae* Dumort., *Carduinae* (Cass.) Dumort., e *Centaureinae* Dumort. Nel 1976 Wagenitz suggerì la separazione delle *Echinopsidinae* in una tribù nuova che Bremer, nel 1994, riportò all'unica tribù delle *Cardueae*. Quest'ultima classificazione è stata confermata da ulteriori analisi effettuate da Susanna *et al.*, 1995. Recentemente è stata proposta una quinta sottotribù, *Cardopatiinae* Juss., comprendente due generi e collocata in una posizione intermedia tra le *Carlininae* Dumort. e il resto della tribù delle *Cardueae* (Garcia-Jacas *et al.*, 2002; Susanna & Garcia-Jacas, 2007). Le sottotribù *Carlininae*, *Cardopatiinae* Less. e *Echinopsidinae* o *Echinopsinae* vengono considerate basali, mentre *Carduinae* e *Centaureinae* costituiscono un gruppo monofiletico più avanzato (Bremer, 1994; Susanna *et al.*, 1995; Petit, 1997; Haffner & Hellwig, 1999; Susanna & Garcia-Jacas, 2007). In particolare le *Carlininae* sono considerate il sister group del resto della tribù e il probabile carattere plesiomorfico è la presenza dei fiori del raggio nel genere *Atractylis* L., mentre il resto della sottotribù possiede solo i fiori del disco. D'altro canto la monofilia delle *Centaureinae* è comprovata da diversi studi (Susanna *et al.*, 1995; Hellwig, 1996) mentre le *Carduinae* vengono considerate un raggruppamento parafiletico poiché solo una parte di esse costituisce il sister group delle *Centaureinae* (Bremer, 1994; Haffner & Hellwig, 1999; Susanna *et al.*, 2006).

Il genere *Cirsium*

Il genere *Cirsium* Mill. fu istituito da Miller nel 1754. Il nome deriva direttamente da una parola greca indicante i cardi. Il genere è formato da specie erbacee bienni, perenni e, raramente, annuali. Si tratta di piante spinose, con foglie alternate, da intere a pennatosette, con margine spinuloso o pagina superiore setoloso-spinosa, spesso aventi lobi dentati e spinosi. Le brattee dell'involucro sono embricate e solitamente con una sola spina semplice apicale. Il ricettacolo è munito di numerose pagliette setacee. Le infiorescenze sono ermafrodite, raramente unisessuali, di colore porpora o giallastro, raramente bianco. Le antere sono munite di appendici basali lunghe da 0,3 a 1,5 mm. Gli acheni sono oblunghi, gibbosi e compressi lateralmente, con apice troncato su cui si nota un distinto orlo ad anello al cui centro è presente una proiezione obconica. Il pappo è formato da diverse serie di setole per lo più piumose (Werner, 1976) (Fig.5). Il genere è costituito da oltre 250 specie diffuse in America settentrionale, Europa, Nord Africa e Asia, ma comuni e diversificate soprattutto sulle montagne dell'Europa meridionale e nel Caucaso (Bureš *et al.*, 2004).

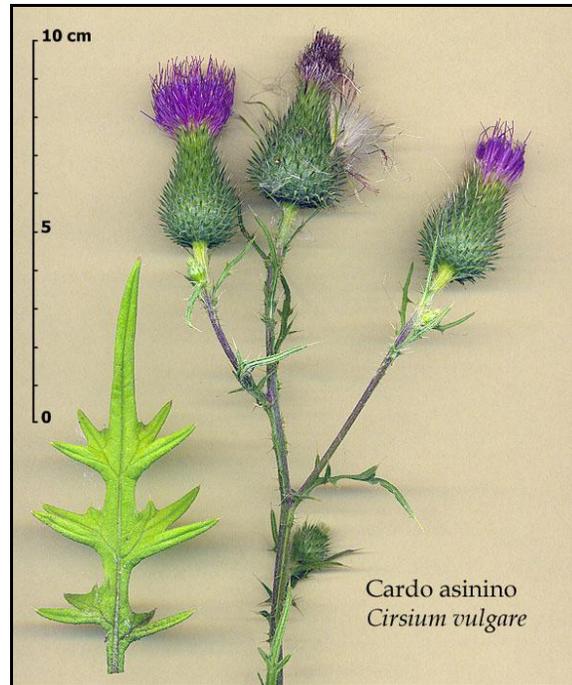


Fig. 5: *Cirsium vulgare*, rappresentante del genere *Cirsium*

<http://www.neorurale.net/agroittica/diarionaturalista/Italiano/cassinazza/fiori/pic04/cirsium%20vulgare.jpg>

Cirsium si differenzia dal genere *Carduus* L., per i peli del pappo, che sono dentellato-scabri in *Carduus*, piumosi in *Cirsium* (Fig. 6); tuttavia, Bremer (1994) sostiene che tale distinzione, basata su un singolo carattere, sia inconsistente.



Fig. 6: Pappo peloso e pappo piumoso delle *Asteraceae*

Peculiarità che, invece, ben distingue *Cirsium* dai generi affini sembra essere la forma dell'achenio, cilindrico-compressa a sezione ellittica (Pignatti, 1982) (Fig. 7).

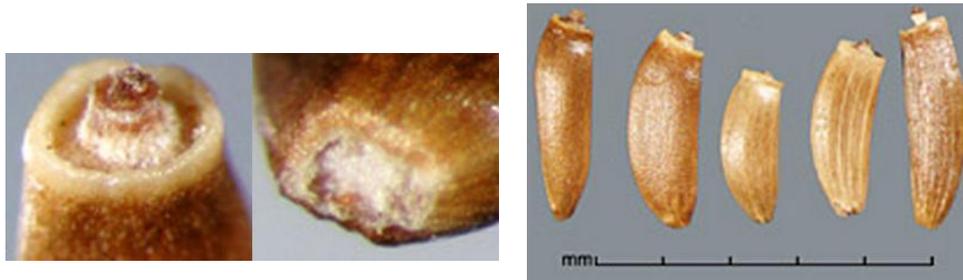


Fig. 7: Achenio cilindrico compresso a sezione ellittica

La presenza di un considerevole numero di specie all'interno del genere ne ha indotto la suddivisione in differenti sezioni in ciascuna delle quali le specie condividono specifici tratti morfologici. La sezione maggiormente diffusa e conosciuta è la sezione *Cirsium* (sect. *Chamaeleon* DC.) comprendente specie caratterizzate da un pappo più corto (o raramente uguale) rispetto alla corolla (Werner, 1976) nonché assenza di spine sulla lamina fogliare (Fig.8). La

sezione *Cephalonoplos* DC., comprendente solo *Cirsium arvense* (L.) Scop., é caratterizzata da un pappo della stessa lunghezza della corolla e fiori unisessuali (Fig. 9). La sezione *Eriolepis* (Cass.) Dumort., per alcuni *Epitrachys* DC.(ad es. Häffner & Hellwig, 1999) (Fig. 10).



Figg. 8,9,10: Rappresentanti delle sezioni *Cirsium*(*Cirsium palustre*), *Cephalonoplos* (*C. arvense*) ed *Eriolepis* (*C. lobelii*)

Vi sono, poi, le sezioni appartenenti al subgenere *Eucirsium* Petr. (Petrauk, 1917), a distribuzione americana, ulteriormente suddivise in sei sottosezioni.

Cirsium è un taxon parafiletico in quanto dovrebbe annoverare alcune specie attualmente incluse nei generi *Notobasis* Cass.e *Carduus* di fatto presenti all'interno della sua linea di discendenza, in accordo con dati ITS (Häffner & Hellwig, 1999); tuttavia, sebbene *Cirsium* sia parafiletico, al suo interno possono essere individuati dei gruppi monofiletici, in particolare il gruppo formato dai rappresentanti di *Cirsium* a distribuzione americana. Nell'ambito di questi ultimi vi è un numero rimarchevole di specie endemiche, le quali colonizzano una vasta eterogeneità di ambienti (canyon rocciosi, praterie, dune costiere e lacustri, radure e foreste) e mostrano una diversità ecologica ingente rispetto alla divergenza molecolare (Kelch & Baldwin, 2003).

La sezione *Eriolepis*

Cassini (1826) separò alcuni *Cirsium* in un nuovo genere *Eriolepis* che però oggi solo una minoranza di botanici ritiene tale. Esso infatti è di norma considerato come una semplice sezione del genere *Cirsium* (i.e. Werner, 1976). La sezione *Eriolepis* (Cass.) Dumort. (dal greco “a squame lanuginose”) è caratterizzata da squame dell’involucro a margini non dentellati, lineari, numerose, portanti una spina robusta e dritta all’apice, rivestite da un indumento ragnateloso più o meno denso; possiede foglie generalmente coriacee, pennatosette, divise fino alla base in 2 lobi divaricati, con setole rigide e piuttosto pungenti sulla pagina superiore. I fiori sono ermafroditi oppure, quelli esterni sono funzionalmente maschili o sterili. Il lembo della corolla è diviso in 5 parti fino a circa la metà, più o meno lungo quanto il tubo. Il pappo è più breve o eguale alla corolla (Fig.11). La sezione è rappresentata in Europa da 29 specie (Werner, 1976). Queste specie abitano generalmente i luoghi aperti e aridi; nel Mediterraneo sono più comuni nella fascia collinare e soprattutto montana, per lo più nei pascoli, dove a causa della pressione selettiva da parte degli erbivori possono divenire comunissime e talora dominanti se non addirittura infestanti. La specie maggiormente diffusa è *Cirsium vulgare* (Savi) Ten., comunissima nei boschi degradati e negli ambienti ruderali e sinantropici tuttavia alcune specie, come *C. lacaitae* Petr., sono più comuni nei cedui e nei boschi. In Italia si trovano 12 specie del gruppo: *C. ferox* (L.) DC., *C. vallis demoniis* Lojac., *C. lacaitae*, *C. eriophorum* (L.) Scop., *C. spathulatum* (Moretti) Gaudin spesso considerato quale una sottospecie del *Cirsium eriophorum*, *C. scabrum* (Poir.) Bonnet & Barratte, *C. echinatum* (Desf.) DC., *C. vulgare* e *C. italicum* (Savi) DC.

Ad eccezione dei tetraploidi *C. vulgare* e *C. ciliatum* ($2n=68$), tutte le specie della sezione sono diploidi $2n=34$.



Fig.11: *Cirsium lobelii* appartenente alla sezione *Eriolepis*

SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo di questo studio è la revisione molecolare del genere *Cirsium* ed in particolare delle specie appartenenti alla sezione *Eriolepis*, attraverso l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare per l'amplificazione e il sequenziamento di specifiche regioni di DNA. L'identificazione morfologica degli individui appartenenti alle singole specie è stato il primo obiettivo in ordine di tempo; di seguito si è proceduto alla caratterizzazione molecolare delle stesse al fine di ottenere una filogenesi convergente. La necessità di realizzare questo lavoro è nata dall'incertezza che contraddistingue le attuali classificazioni, principalmente basate su caratteri morfologici difficilmente osservabili e spesso riscontrati in esemplari appartenenti a differenti specie, sebbene considerati esclusivi per alcune di esse. Inoltre, la mancanza di barriere riproduttive fra le specie del genere *Cirsium* aumenta la consapevolezza di poter riscontrare in natura, con un'alta frequenza, la presenza di intermedi, probabilmente ibridi, così come spesso accade nell'intera famiglia delle *Asteraceae*. Tali individui hanno, inoltre, la particolarità ecologica di formare popolazioni ibride, omogenee, in assenza delle specie da cui presumibilmente si sono originate; ciò sembra essere spiegato con un miglior adattamento del genotipo ricombinante all'ambiente rispetto alle specie parentali (Anderson, 1948; Moore, 1977; Arnold, 1997). In Italia è notevole l'esempio del "gruppo di *C. eriophorum*" (Pignatti, 1982), che include *C. eriophorum* (L.) Scop., *C. tenoreanum* Petrak, *C. morisianum* Rchb., *C. lobelii* Ten., *C. lacaitae* Petrak, *C. ferox* (L.) DC., *C. vallis demoniis* Lojac. Nell'ambito di tale raggruppamento risulta difficile rinvenire peculiarità morfologiche consistenti e vi è un'elevata probabilità che le specie

costituenti siano ibride. L'origine di forme intermedie differenti può essere riconducibile ad introgressione, sebbene non siano disponibili dati relativi a tale ipotesi (Werner, 1976). La natura controversa del “gruppo di *Cirsium eriophorum*” è un ulteriore tema di indagine nel corso di questo progetto di ricerca al fine di risolverne al meglio i rapporti filogenetici, così come la risoluzione definitiva della posizione di *Cirsium lacaitae*, unica specie endemica campana, nei confronti delle altre specie del gruppo di *Cirsium eriophorum* ad essa molto simili e *C. vulgare* da cui, per incrocio con *C. lobelii*, essa sembrerebbe derivare (Pignatti, 1982). Nell'ambito di tale studio è infine auspicabile una definitiva risoluzione della posizione filogenetica di alcuni generi satelliti del genere *Cirsium* ovvero il genere *Picnomon*(L.) Cass., il genere *Notobasis* Cass. e il genere *Tyrimnus* Cass.

VARIABILITÀ ED EVOLUZIONE DEL GENOMA

Il genoma o patrimonio genetico è l'informazione ereditabile di un organismo includendo sia i geni che il DNA non codificante. Esso contiene tutte le informazioni necessarie alla sua sopravvivenza nonché alla determinazione delle relazioni evolutive con altri genomi (Awise, 1994). La trasmissione di tale informazione lungo una linea evolutiva avviene per mezzo della replicazione del DNA. Tale processo, sebbene sia molto accurato e dotato di sistemi di riparazione, può generare errori che talvolta si fissano all'interno della popolazione. Gli errori nella trasmissione genetica sono, quindi, alla base dei processi evolutivi che hanno prodotto nel tempo l'enorme diversità delle forme di vita attuali.

La grande variabilità riscontrabile all'interno di un genoma risulta dai cambiamenti nella sua composizione nucleotidica, avvenuti nel tempo, in maniera casuale; pertanto, essa non è altro che una misura della tendenza stocastica degli individui di una popolazione a differenziarsi l'uno dall'altro, nel tempo. Tale variabilità è alla base dell'evoluzione e si esplica sottoforma di alleli multipli per uno o più loci.

Oltre alle mutazioni geniche esistono numerose altre fonti di variabilità in una popolazione: poliploidia, ricombinazione genetica, selezione naturale ed ambiente. Il genotipo o variante genetica interagisce con l'ambiente per produrre il fenotipo o variante osservata (Lowe *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 1998). Anche

le modalità di riproduzione possono influenzare la variabilità genetica tra le popolazioni (Hamrick & Godt, 1990), tendendo ad annullarla nell'autofecondazione e nell'accoppiamento tra consanguinei o tendendo ad aumentarla nell'accoppiamento casuale.

Infine, l'isolamento geografico può portare ad una fissazione delle frequenze alleliche con conseguente perdita di variabilità genetica al contrario di quanto accade quando, fra popolazioni, vi è flusso genico casuale e ricombinazione (Culley & Wolfe, 2001).

Le mutazioni, ancora, possono interessare un singolo nucleotide o sequenze più o meno lunghe di basi creando così nuovi alleli con destini evolutivi differenti e casuali.

Di norma i tassi di mutazione sono molto bassi, dell'ordine di 10^{-6} per gene per generazione, ma aumentano in specifici punti del genoma detti "hot spots", dove possono ritrovarsi nell'ordine di 10^{-3} (Weber & Wong, 1993).

Il fenomeno dell'ibridazione

L'insorgenza di barriere ecologiche e l'innalzamento di barriere riproduttive sono fenomeni abbastanza comuni in natura, nonché cause responsabili della formazione e della differenziazione delle specie. E' tuttavia possibile ottenere incroci tra specie diverse di qualsiasi famiglia animale o vegetale e tali individui sono chiamati ibridi. Nel mondo animale i casi di ibridazione sono relativamente pochi poiché impediti da meccanismi di isolamento riproduttivo che prevengono l'accoppiamento tra individui appartenenti a specie diverse; inoltre, laddove si verifichi l'incrocio, gli ibridi sono perlopiù sterili. Nel regno vegetale invece, l'incontro tra gameti di specie diverse è un fenomeno molto più comune e l'ibridazione generalmente è evitata grazie a meccanismi di isolamento post-impollinazione; tuttavia essa può dar vita ad incroci fertili. Si ritiene, infatti, che molte specie vegetali possano essere di origine ibridogena (Ellstrand *et al.*, 1996; Rieseberg, 1997) e secondo alcune stime (Stace, 1987), il 50-70% delle Angiosperme attualmente esistenti si è originato in seguito a fenomeni di ibridazione. Il ruolo dell'ibridazione nell'evoluzione è stato discusso per più di un secolo (Rieseberg *et al.*, 2003) e due sono le principali posizioni che ne sono emerse. Molti studiosi sostengono la mancanza di incisività del fenomeno dell'ibridazione che sembrerebbe essere un evento locale con effetti transitori, una sorta di "disturbo evolutivo" (Wagner, 1970; Schemske, 2000). L'idea che gli ibridi fossero caratterizzati da bassi livelli di fertilità e di vitalità ha portato ad una sottovalutazione del ruolo evolutivo dell'ibridazione (Mayr, 1963; Wagner, 1969, 1970; Barton & Hewitt, 1985). Tale ipotesi, sostenuta da dati di letteratura (Heiser, 1947; Clausen, 1951; Grant, 1966) riguardanti soprattutto specie con forti barriere post-impollinazione, può essere spiegata dalla dissociazione genica tra i loci coinvolti nel riarrangiamento (Dobzhansky, 1937). Il fatto che generalmente

gli ibridi mostrino un basso successo riproduttivo, non esclude la possibilità che alcuni di essi, posti nello stesso ambiente delle specie parentali, possano avere una fitness uguale o maggiore di quella delle specie parentali, come verificato nel lavoro di Barton del 2001. Una significativa associazione genotipo-ambiente è stata, inoltre, osservata popolazioni di ibridi che si trovavano in ambienti diversi da quelli dei parentali. Presumibilmente ciò indica che ci possa essere una selezione positiva per il genotipo ibrido quando si trova in un ambiente ad esso favorevole (Stebbins & Daly, 1961; Cruzan & Arnold, 1993, 1994; Arnold, 1997) tale da potergli far occupare una nuova e differente nicchia ecologica. Tali risultati hanno portato i fautori della posizione di contrasto, specialmente botanici, a considerare l'ibridazione una potente forza evolutiva che crea opportunità per fenomeni di evoluzione adattativa e per eventi di speciazione (Arnold, 1997; Rieseberg & Carney, 1998; Rieseberg *et al.*, 2003). Anderson (1949) è stato il primo a comprendere la funzione degli ibridi come ponte per lo scambio di caratteri adattativi tra le specie. Le conseguenze evolutive dell'ibridazione possono essere molteplici (Stebbins, 1959). La più nota è il fenomeno dell'introggressione. Questa, descritta per la prima volta da Anderson e Hubricht (1938), è definita come il trasferimento genico mediato da accoppiamenti tra ibridi e specie parentali che può condurre ad evoluzione adattativa e di conseguenza formazione di nuove specie. Martinsen *et al.*, (2001) hanno suggerito che gli ibridi possano agire come filtro evolutivo, lasciando passare solo geni vantaggiosi e prevenendo l'introggressione di quelli negativi. Le nuove specie possono risultare capaci di colonizzare nuovi habitat (Lewontin & Birch, 1966; Anderson, 1948; Moore, 1977; Arnold, 1997) e quindi essere favorite nella selezione naturale. Il processo di introggressione di caratteri adattativi potrebbe essere, quindi, il principale contributo evolutivo dell'ibridazione nelle piante (Anderson, 1949;

Lewontin & Birch, 1966), sebbene la potenziale funzione creativa dell'ibridazione dipenda in modo determinante, dal successo riproduttivo dell'ibrido (Arnold & Hodges, 1995).

Sistematica classica e filogenesi molecolare

La sistematica è definita come lo studio della diversità degli organismi viventi e delle relazioni che intercorrono tra loro (Simpson, 1961); è la scienza che si occupa di classificare i viventi ed è quindi alla base di tutta la biologia comparativa (Whitehead, 1990). Le classificazioni dei viventi hanno due compiti fondamentali: fornire chiavi di identificazione basate su differenze o similitudini tra gruppi diversi ed esprimere le relazioni filogenetiche. Questi due compiti sono assolti dalle due principali branche di cui si compone la sistematica ovvero la tassonomia e la filogenesi. La tassonomia che è teoria e pratica di descrivere, identificare e classificare gli organismi (Mayr, 1969), si occupa della definizione degli individui a differenti livelli. La filogenesi, invece, è la disciplina che si propone di ricostruire le relazioni evolutive tra gli organismi. Fin dall'antichità si sono avuti tentativi di classificare forme animali e vegetali ma è con il *Sistema Naturae* (1735) di Linneo (Carl von Linné, 1707-1778), in cui egli descrive tutte le specie viventi allora conosciute, che la sistematica acquista una forma scientifica. Le "categorie sistematiche" di Linneo, tutt'oggi in uso, sono come degli insiemi gerarchici di diversa ampiezza con le categorie di ordine superiore che contengono quelle di ordine inferiore. Il livello tassonomico più elevato è il regno ed ogni regno è suddiviso in una serie di categorie sempre più ristrette e con specifiche caratteristiche. La specie è il livello gerarchico di interesse sistematico più basso nonché la categoria più conosciuta e più importante della classificazione di Linneo. La sistematica classica cerca di ordinare tutte le specie esistenti (o estinte), in base a criteri di somiglianza e differenza morfologica cercando di stabilirne "parentele" evolutive.

La sistematica o filogenesi molecolare, invece, è una scienza che si origina dai tradizionali campi della sistematica e della genetica molecolare. Il suo scopo è quello di utilizzare i dati sulla costituzione molecolare degli organismi biologici (DNA o RNA) e applicarli alla risoluzione di problemi di sistematica. Si utilizzano differenze e somiglianze tra genomi per quantificare il grado di parentela delle due specie a cui appartengono e il momento nella storia evolutiva in cui si sono divise, non dimenticando il valore del cosiddetto orologio molecolare ovvero la proporzionalità diretta tra numero di sostituzioni nucleotidiche o aminoacidiche che si accumulano nei genomi e tempo intercorso per la loro divergenza. Nella sistematica evolucionistica risulta fondamentale la scelta delle caratteristiche da considerare nell'analisi e che peso dare a ciascuna di esse. Tali caratteristiche verranno poi utilizzate per definire le categorie e delineare la filogenesi del gruppo in esame. Gli organismi viventi ed estinti vengono, poi, inseriti all'interno di un "albero filogenetico" secondo questa ricostruzione e in base ad una sequenza temporale.

Gli alberi filogenetici

Le relazioni evolutive tra gli organismi possono essere modellizzate mediante la costruzione di alberi filogenetici. Un albero filogenetico è la rappresentazione grafica bidimensionale delle ipotetiche relazioni filogenetiche tra più taxa, basata sul susseguirsi di dicotomie evolutive. Un albero filogenetico è costituito da nodi e rami ai cui estremi sussistono gli individui che stiamo analizzando, che siano essi rappresentanti di specie, generi o qualsiasi altro livello sistematico ovvero sequenze note che si vogliono confrontare. I nodi interni rappresentano ipotetici antenati sconosciuti dei nostri individui, nonché l'ultimo antenato comune dei due gruppi che insistono a valle dello stesso nodo. I rami definiscono le relazioni in termini di discendenza evolutiva. Da ogni nodo si dipartono almeno tre rami: due discendenti laddove troviamo gli individui derivati ed uno ascendente verso il nodo progenitore; talvolta è possibile avere alberi politomici, ovvero alberi che abbiano in un nodo più di due rami discendenti; in tal caso l'albero si dice non completamente risolto. Esistono due categorie di metodiche per la costruzione degli alberi filogenetici: i metodi basati su algoritmi di clustering e i metodi di ottimizzazione. La prima tipologia di albero la si ottiene a partire da una definizione di distanza tra sequenze e per questo motivo sono anche detti metodi di distanza, il Neighbor-joining e l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ne sono esempi. Nell'utilizzo di tali metodiche si procede convertendo un multiallineamento di sequenze in una matrice delle distanze, una matrice i cui valori rappresentano le diversità tra le sequenze. Tale matrice sarà poi utilizzata come dato noto per l'algoritmo di costruzione dell'albero in questione.

L'albero filogenetico che ne deriva è un dendrogramma la cui lunghezza dei rami è proporzionale alla distanza evolutiva tra i nodi. I metodi di ottimizzazione invece, si basano sulle sequenze ovvero considerano durante l'analisi di-

rettamente ogni sito delle sequenze o qualche funzione su calcolata di essi come, ad esempio, la probabilità della presenza di un carattere piuttosto che un altro. In questo modo è possibile valutare direttamente l'attendibilità di ogni posizione in base ad un confronto diretto con i caratteri nello stesso sito ma all'interno delle altre sequenze allineate, ne sono esempi il metodo della massima parsimonia e quello della massima verosimiglianza. Questi metodi hanno come vantaggio quello di partire direttamente dalle sequenze e non da una matrice di distanze evitando la perdita di una parte dell'informazione conseguente al multi-allineamento delle sequenze, tuttavia aumenta la complessità del calcolo che rende i metodi inutilizzabili nel caso di grandi set di dati. L'albero filogenetico che ne deriva è un cladogramma che descrive esclusivamente le relazioni filogenetiche tra i vari nodi senza che la lunghezza dei diversi rami abbia significato.

L'analisi cladistica

Hennig (1913-1972) è il padre di questo nuovo approccio sistematico, definito tassonomia cladistica o cladistica (dal greco κλάδος *kládos* = ramo). Gli assunti fondamentali della cladistica sono i seguenti: la speciazione deve essere allopatica ovvero le due nuove specie si formano improvvisamente da un antenato comune, per separazione geografica; le caratteristiche da analizzare devono essere omologhe; l'evoluzione parallela di caratteri o gruppi di caratteri deve essere considerata rara; gli organismi con caratteri derivati non possono originare taxa con caratteri primitivi. Le relazioni evolutive sono quindi stabilite a partire dai caratteri condivisi, le omologie o sinapomorfie (Patterson, 1982), presumendo che esse stiano ad indicare la presenza di un antenato comune. Ciò significa che il metodo cladistico è basato interamente sul concetto di monofilia. Il clado monofiletico si contrappone a gruppi che possono essere parafiletici ovvero che comprendono taxa discendenti dallo stesso antenato ma non ne racchiudono l'intera discendenza, oppure polifiletici ovvero che includono taxa facenti parte di diverse linee di discendenza (Patterson, 1982, 1988). Per ciascun carattere viene ricostruita la trasformazione a cui esso è andato incontro dallo stadio più primitivo (plesiomorfo) a quello derivato (apomorfo) e condiviso dai discendenti più recenti. Per effettuare tale analisi viene utilizzato un outgroup ovvero un gruppo esterno al clado in esame, ma vicino ad esso. Derivare dall'outgroup gli stati apomorfici del carattere equivale però ad identificarlo con l'antenato comune compartendo l'assunzione che esso non abbia autapomorfie, ovvero stati derivati non condivisi, ciò in realtà non è verificabile. Le simplesiomorfie sono i caratteri ereditati da un progenitore ancestrale e che vengono considerati irrilevanti nella ricerca delle genealogie poichè condivisi da tutte le specie; tali caratteri testimoniano la primitività del carattere stesso. I caratteri unici di un gruppo o di una specie sono definiti autapomorfie e

anch'essi sono esclusi dalle analisi perché non considerati utili per stabilire rapporti di discendenza tuttavia questi caratteri vengono utilizzati per definire le relazioni interne a ciascun gruppo. I caratteri condivisi solo da alcuni membri del gruppo sono comparsi successivamente ed hanno valore apprezzabile nella definizione dei rapporti di discendenza. Le relazioni tra i taxa sono proporzionali alla quantità di caratteri che essi condividono. Un cladogramma si fonda sul principio di massima parsimonia per la valutazione delle sinapomorfie; secondo tale principio il percorso evolutivo più probabile è quello che necessita del minor numero di passi o ipotesi che spieghino il modello sotto osservazione; laddove per passi evolutivi o ipotesi intendiamo i parallelismi, ossia gli stati condivisi dai taxa in esame non per discendenza ma evolutisi in maniera indipendente, e le reversioni, ovvero caratteri convertiti allo stato pleiomorfico. Tali ipotesi vengono generalmente indicate col termine di omoplasie. Esistono comunque anche altri metodi di inferenza quali il *Maximum likelihood* oppure la *Bayesian inference* utilizzati per la costruzione di cladogrammi.

La massima parsimonia

La parsimonia si basa sull'idea di trovare il minor numero di “passi evolutivi” o assunzioni *ad hoc*, sufficienti a spiegare la variabilità osservata tra le sequenze. Questo criterio afferma che, tra tutti gli alberi che descrivono le relazioni filogenetiche intercorrenti tra N sequenze, occorre scegliere l'albero più parsimonioso, cioè quello che richiede il minor numero di assunzioni per spiegarlo. Essa può essere considerata uno dei numerosi metodi di ottimalità *tout court* per la selezione di alberi (per esempio Swofford *et al.*, 1996). Il metodo della parsimonia, inoltre, utilizza direttamente le sequenze e non le distanze in modo tale da non avere perdita di informazioni nella risoluzione filogenetica. In sostanza poichè ogni mutazione rappresenta di fatto una assunzione, non accedendo alle sequenze ancestrali, il metodo cerca di fare il minor numero di assunzioni possibile per giustificare il risultato a noi visibile. E' possibile, tuttavia, che l'evoluzione di una sequenza non avvenga secondo criteri "parsimoniosi", sottovalutando in tal modo il punto focale della parsimonia cladistica, ovvero l'interesse verso i percorsi che originano il cambiamento dello stato dei caratteri.

Un vantaggio di tale metodo è l'assenza di altre assunzioni oltre alla massima parsimonia, non si assume a priori alcun modello di evoluzione molecolare. La costruzione dell'albero richiede quindi la costruzione delle possibili topologie e il computo del numero minimo di sostituzioni (detto anche lunghezza dell'albero) per ogni topologia; laddove uno svantaggio è rappresentato dall'elevato costo computazionale.

Nella massima parsimonia, un sito è informativo se favorisce uno o più alberi tra tutti i possibili oppure se contiene almeno due differenti caratteri (nucleotidi o aminoacidi) ciascuno dei quali è presente almeno in due sequenze. Da

questo computo sono ovviamente escluse le posizioni che non mostrano sostituzioni e quelle sostituzioni che compaiono una sola volta (singleton sites). L'analisi di parsimonia può diventare inconsistente quando sorge il problema della *branch attraction* (Felsenstein, 1978) che solitamente si verifica in caso di bassa densità di campionamento oppure nel caso in cui solo alcune sequenze in esame hanno accumulato cambiamenti. In studi che simulano tali condizioni, l'aggiunta progressiva di dati all'analisi determina una convergenza sempre maggiore verso la topologia errata (Penny *et. al.*, 1992; Huelsenbeck, 1995). In particolare la *branch attraction* genera parvenza di affinità filogenetica tra taxa in realtà lontani soltanto perché forme intermedie non sono state incluse nell'analisi.

L'analisi bayesiana

L'analisi bayesiana è un approccio di inferenza statistica in cui osservazioni o dati ottenuti, non sono interpretati come frequenze, proporzioni o concetti analoghi ma piuttosto come livelli di fiducia o probabilità nel verificarsi di un dato evento, come anche per aggiornare le probabilità precedentemente calcolate (Hubbard, 2007).

Il nome della metodica deriva dal teorema di Bayes che ne è a fondamento e che a sua volta porta il nome dell'ideatore.

L'inferenza bayesiana è notevolmente impiegata nella filogenesi molecolare (Rannala & Yang, 1996; Yang & Rannala, 1997) generando una distribuzione a posteriori per un determinato parametro sottoforma di un albero filogenetico ed un modello di evoluzione, costruiti sulla base degli alberi precedentemente ottenuti per quel parametro e la probabilità derivante dai dati generati da un allineamento multiplo.

L'approccio bayesiano è diventato più popolare grazie agli algoritmi di Markov Chain Monte Carlo con cui cerca di selezionare la topologia di albero, con la più alta probabilità, considerando i dati inseriti.

Vantaggi di tale metodologia sono l'intuitività, il potenziale utilizzo per qualsiasi modello complesso; la capacità di fornire sia stime dei parametri (ad esempio, alberi) sia la loro probabilità in una singola analisi. Inoltre, possono essere valutate in una singola analisi molte ipotesi diverse. L'algoritmo MCMC rende l'integrazione di tutti i valori dei parametri rapido e preciso. Tuttavia la metodica dell'inferenza bayesiana presenta anche alcuni svantaggi, infatti, è necessario specificare a priori un modello evolutivo, in forma di probabilità a priori; ed ancora, il tempo stimato per l'analisi può essere notevolmente variabile. Infine, la probabilità a posteriori descrive probabilità assolute, che possono essere sovrastimate.

I MARCATORI MOLECOLARI

Il patrimonio genetico è unico per ciascun individuo pertanto le alterazioni genotipiche o polimorfismi che esso presenta ne permettono una rappresentazione individuale. I polimorfismi, dunque, costituiscono dei marcatori molecolari con alto potere discriminante e permettono un'analisi di grande precisione. Dalla metà degli anni settanta, lo sviluppo di nuovi sistemi per l'analisi molecolare ha fornito una ampia varietà di marcatori molecolari, alleli di loci polimorfici (Jones *et al.*, 1997), che hanno un'espressione conservata e che possono essere utilizzati per analizzare la variabilità genomica. Si è così affiancata alla sistematica classica l'analisi molecolare, nella risoluzione delle relazioni filogenetiche a differenti livelli evolutivi. I marcatori del DNA forniscono un'opportunità per caratterizzare i genotipi e misurare i rapporti filogenetici con maggiore precisione rispetto a quanto è possibile fare con altre metodiche (Soller & Beckmann, 1983); inoltre, permettono di effettuare sia analisi della variabilità intraspecifica che studi sulle relazioni filetiche (Frankham & Ballou, 2002); infine, sono di facile definizione ed osservazione nonché ereditabili secondo il modello mendeliano o per via uniparentale. I marcatori molecolari sono *geni* o *sequenze di DNA* di dimensioni variabili solitamente tra 50 e 3.000 bp, comprese tra due regioni oligonucleotidiche note dette primers che, in virtù della loro presenza, contraddistinguono in modo caratteristico il tratto cromosomico con il quale si identificano. I marcatori molecolari possono essere presenti in regioni non codificanti del DNA ed in tal caso sono detti marcatori neutrali oppure in regioni codificanti del DNA ed in tal caso si tratta di marcatori funzionali. I primi studi sulla variabilità genetica tramite l'uso di

marcatori molecolari si basavano su analisi dei polimorfismi proteici, con la possibilità di distinguere gli alleli proteici (allozimi) in base alla loro differente velocità di migrazione in un gel sottoposto a corsa elettroforetica. Lo sviluppo di metodiche, in tempi recenti, per l'individuazione di polimorfismi direttamente nella struttura e composizione delle sequenze nucleotidiche di DNA e RNA ha permesso l'identificazione di marcatori con un livello di affidabilità nettamente maggiore nello studio della diversità genetica di tipo neutrale (Procaccini & Maltagliati, 2004). Successivamente si è aumentata la possibilità di applicazione dei marcatori molecolari con il clonaggio ovvero con l'inclusione di frammenti specifici di DNA in vettori plasmidici e la crescita in sistemi batterici dopo infezione oltre che con lo sviluppo del sequenziamento del DNA e con lo sviluppo dei microarrays per lo studio dei polimorfismi di espressione genica in migliaia di cloni genomici immobilizzati su supporti sintetici (Shena *et al.*, 1995). Anche l'avvento della PCR (Polymerase chain reaction) e del sequenziamento automatico, che permettono l'accesso diretto all'analisi delle sequenze di DNA, hanno aumentato ulteriormente il campo di applicazione dei marcatori molecolari; tuttavia, è sicuramente di prioritaria importanza la scelta del marcatore molecolare più appropriato al tipo di analisi da affrontare in funzione delle caratteristiche del marcatore (dominanza, riproducibilità, velocità di utilizzo, costo), delle caratteristiche del DNA in analisi (localizzazione e quantità) e del livello d'indagine che si sta effettuando (individuo, popolazione, specie), al fine di ottenere i migliori risultati (Procaccini & Maltagliati, 2004; Lowe *et al.*, 2004). Marcatori molecolari del DNA nucleare comunemente utilizzati sono quelli del DNA codificante per gli RNA ribosomali, l'rDNA. In realtà questa porzione di DNA risulta esser et altamente conservata nelle regioni codificanti tuttavia tali regioni si presentano in alternanza con regioni spaziatrici non codificanti maggiormente variabili: gli ITS e

gli ETS. Le intere regioni dell' rDNA codificanti risultano separate tra loro oltre che da due regioni ETS (external transcribed sequence) (Kelch & Baldwin, 2002) anche da un NTS (not transcribed sequence), il cui insieme è detto IGS (intergenic spacer). L'IGS è compreso quindi tra la fine dell'esone 26 S e l'inizio del 18 S (Kelch & Baldwin, 2002) e risulta mediamente variabile. Le regioni ITS (intergenic transcribed sequence) (Baldwin *et al.*, 1995) risultano anch'esse mediamente variabili e permettono un'analisi adeguata della diversità genetica a basso livello gerarchico. All'interno dello stesso organismo tali strutture geniche si presentano molto simili, omogeneità nota come evoluzione concertata (Arnheim *et al.*, 1980) e dovuta ad una notevole pressione selettiva insistente su tali sequenze geniche. ETS ed ITS insieme sono stati impiegati con successo in diversi studi effettuati sulle Asteraceae (Baldwin & Markos, 1998; Clevinger & Panero, 2000). Altri marcatori interessanti nello studio della variabilità inter- e intraspecifica sono i marcatori plastidiali quali lo spaziatore intergenico *psbA-trnH* (Hamilton, 1999; Demesure *et al.*, 1995), individuato anche come un buon marcatore a livello intergenerico ed infragenerico nelle Asteraceae (Ford *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) nonché considerato la regione intergenica tra le più variabili del genoma plastidiale, ragione per cui rappresenta un buon candidato come per la risoluzione del DNA barcoding nelle piante (Kress *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005; Shneyer, 2009). Lo spaziatore intergenico *trnC-ycf6* (Shaw *et al.*, 2005, modificato da Demesure *et al.*, 1995) nonché l'introne del gene plastidiale *rps16* dal noto potenziale informativo infragenerico (Oxelman *et al.*, 1997). Il DNA plastidiale condivide alcuni dei vantaggi indicati per le regioni ribosomali nucleari, quali l'abbondanza e la conservatività di molti tratti, nonché la presenza di regioni spaziatrici non codificanti maggiormente variabili; inoltre, essendo il genoma plastidiale come quello mitocondriale ereditato per via matrilineare nelle angiosperme (Reboud

& Zeyl, 1994), esso permette l'individuazione di specie ibridogene, risultando così efficace negli studi filogeografici.

Il genoma nucleare: ITS

Le regioni spaziatrici ITS (internal transcribed sequence) appartengono al DNA ribosomale nucleare e con esso costituiscono una frazione molto abbondante dell'intero genoma, corrispondente approssimativamente al 10% (Hemleben *et al.*, 1988). Tale DNA risulta organizzato in cluster genici, costituiti da ripetizioni in tandem disperse su numerosi cromosomi (Thompson & Flavell, 1988; Appels & Dvorak, 1992).

Gli ITS sono compresi tra unità trascrizionali conservate di DNA avvero 18 S, 5.8 S e 26 S. L'ITS 1 è compreso tra la fine del 18 S e l'inizio del 5.8 S, l'ITS 2 tra la fine del 5.8 S e l'inizio del 26 S.

La lunghezza dei singoli cistroni differisce tra le specie, sebbene studi sulla variabilità dei siti di restrizione del DNA ribosomale in popolazioni di animali e piante abbiano dimostrato che le regioni codificanti sono molto conservate nella grandezza (Takaiwa *et al.*, 1985; Nickrent & Soltis, 1995; Bult *et al.*, 1995). Tale diversità di lunghezza è quindi spiegata da una notevole variabilità delle regioni spaziatrici non codificanti (Gerbi, 1985) ed infatti anche l'IGS, non codificante, varia da 1 a 8 Kb (Jorgensen & Cluster, 1988).

Differenze in lunghezza nella popolazione degli ITS sono state riscontrate in un'ampia varietà di piante (Schaal *et al.*, 1987; Wilson *et al.* 1984), sebbene la lunghezza si mantenga piuttosto uniforme all'interno delle fanerogame (400-500bp). Per le regioni spaziatrici si è riscontrato, inoltre, un tasso evolutivo più elevato (Severini *et al.*, 1996).

Gli spaziatori ITS sono presenti in tutti i geni nucleari eucariotici per l'rRNA (Jorgensen *et al.*, 1987; White *et al.*, 1991) ed essendo fiancheggiati da tre regioni codificanti altamente conservate è facile identificare primer di PCR pressoché universali utili per la loro amplificazione, da sequenze già pubblica-

te, anche di organismi relativamente distanti (Severini *et al.*, 1996). Allineamenti dell'ITS2, a livelli gerarchici piuttosto elevati, hanno mostrato ben il 50% di coincidenza (Hershkovitz & Zimmer, 1996).

I differenti tassi di evoluzione dell'rDNA, la struttura secondaria delle regioni trascritte ed il modello di sviluppo concordato tipico delle copie ripetute, danno al DNA ribosomale un'alta versatilità sistematica (Long & Dawid, 1980; Gerbi, 1985; Hillis & Dixon, 1991): le regioni codificanti risultano principalmente utilizzate nelle ricostruzioni filogenetiche ad ampio spettro; le regioni spaziatrici, invece, sono utili per le analisi filogenetiche tra specie correlate o tra popolazioni della stessa specie (Doyle & Beachy, 1985) comportandosi come indicatori ben adattati per le analisi filogenetiche a basso livello gerarchico (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995).

Ad ogni modo, sono state riscontrate all'interno delle sequenze ITS più regioni conservate, le quali suggeriscono una non completa libertà di evoluzione ad un tasso neutro (Schlötterer *et al.*, 1994). Studi condotti su lieviti hanno dimostrato che gli ITS giocano un ruolo fondamentale nelle reazioni di maturazione dei precursori degli RNA indicando che è la struttura secondaria di questi spaziatori ad essere importante per le reazioni medesime; essi, infatti, non sono incorporati nei ribosomi ma si sono riscontrate anomalie nella maturazione di tali rRNA, a seguito di delezioni degli ITS (Van der Sande *et al.*, 1992). Questi studi hanno contribuito a spiegare le ragioni della pressione selettiva che insiste su tali sequenze.

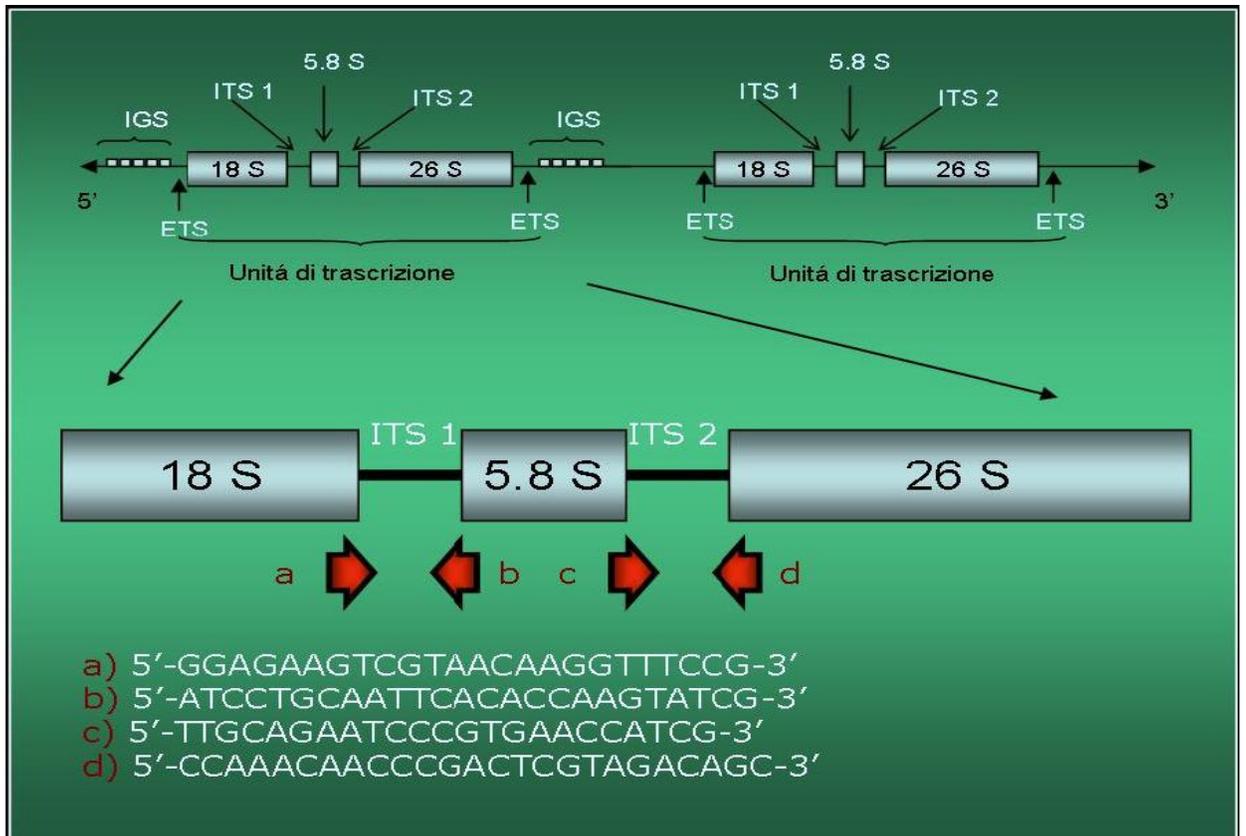


Fig.12: Regioni ITS1 e ITS2 del genoma nucleare

ETS

Le sequenze ETS (external transcribed sequence), comprese tra la fine del 26S e l'inizio del successivo 18S, appartengono alla stessa unità trascrizionale delle sequenze ITS, il che ne evidenzia un probabile e interdipendente ruolo nella maturazione dell'rRNA (es., Musters *et al.*, 1990; Good *et al.*, 1997; Hitchen *et al.*, 1997). Nelle *Asteraceae* l'ETS è generalmente più lungo dell'ITS (Bena *et al.*, 1998) nonché maggiormente variabile, come dimostrato da Kim & Mabry (1991) e Sytsma & Schaal (1985), tramite studi condotti su siti di restrizione. Inoltre, per la famiglia delle *Asteraceae*, la regione ETS (circa 400-650 bp a monte della regione 18S), è stata utilizzata come marcatore negli studi filogenetici di varie tribù (es., Baldwin & Markos, 1998; Clevinger & Panero, 2000; Linder *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Markos & Baldwin, 2001; Lee *et al.*, 2002) e si è vista essere variabile tanto quanto le regioni ITS1 e ITS2 combinate. Tuttavia non esiste una regione altamente conservata in prossimità dell'estremità 5' (Volkov *et al.*, 1996) pertanto, risulta difficile sequenziare l'intero ETS separatamente dalle zone tradotte confinanti (Morgan, 2003). Baldwin & Markos nel 1998 hanno sviluppato primer interni per ETS tali da ottenere circa la metà dell'intera sequenza e con essa hanno notevolmente contribuito alla ricostruzione filogenetica delle *Heliantheae* (*Asteraceae*). Nonostante il notevole potenziale risolutivo di questo marcatore, esso non è ampiamente utilizzato nelle ricostruzioni filogenetiche poiché non è chiaro come l'evoluzione concertata operi su di esso (Linder *et al.*, 2000). A differenza delle regioni ITS, le regioni ETS delle angiosperme di solito posseggono un piccolo numero di lunghe ripetizioni (circa 130 bp) in tandem (es. Schmidt-Puchta *et al.*, 1989; King *et al.*, 1993; Baldwin & Markos, 1998) nell'estremità 5' della regione, le quali possono alterare il tasso di evoluzione concertata come accade nel caso delle ripetizioni dello spaziatore non

trascritto NTS (Appels & Dvorak, 1982). L'ETS è comunque considerato un buon candidato per incrementare o sostituire i dati ITS quando manca per quest'ultimo un apprezzabile segnale filogenetico (Clevinger & Panero, 2000; Linder *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Markos & Baldwin, 2001; Lee *et al.*, 2002; Baldwin & Markos, 1998; Bena *et al.*, 1998).



Fig 13: Rappresentazione grafica dell'ETS all'interno dell'nrDNA

Il genoma plastidiale

L'origine dei plastidi è legata alla teoria endosimbiontica secondo la quale tali organelli si sono originati mediante fagocitosi di un batterio fotosintetico a vita libera (probabilmente un cianobatterio) da parte di un organismo eucariota non fotosintetico (Schimper 1883; Gray, 1992; Douglas, 1994). Ciò è spiegato dalla presenza di un genoma proprio. Il DNA plastidiale è un filamento circolare di 0,04mm-0,3 mm di lunghezza caratterizzato da una marcata presenza della coppia guanosina-citosina. Avendo un DNA proprio e dei propri ribosomi i plastidi sono degli organuli semiautonmi capaci di sintetizzare proteine indipendentemente dall'informazione genetica del genoma nucleare.

Il genoma plastidiale è ben caratterizzato e strutturalmente molto stabile (Clegg *at al.*, 1994) pertanto le sequenze del DNA plastidiale sono una fonte primaria di dati per dedurre la filogenesi delle piante (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Alvarez & Wendel, 2003), contribuendo notevolmente alle richieste della genetica di popolazione e della sistematiche a basso livello (McCaughey, 1995; Provan *et al.*, 2001).

Il DNA plastidiale è stato dapprima esaminato attraverso lo studio dei polimorfismi dei siti di restrizione (Olmstead & Palmer, 1994); in seguito, a partire dalle osservazioni di Ritland & Clegg (1987) e Zurawski & Clegg (1987), non appena si è resa disponibile la tecnologia di sequenziamento del DNA, si sono accumulati studi comparativi sulle sequenze del cpDNA. Contemporaneamente si andava esplorando la possibilità che le regioni non codificanti del DNA plastidiale fossero idonee per studi tassonomici a bassi livelli gerarchici, presupponendo che nelle regioni non codificanti fosse minore la pressione selettiva rispetto alle regioni codificanti e ciò fornisse maggiori livelli di variazione utile per le analisi filogenetiche (Gielly & Taberlet, 1994).

A seguito di questi studi pionieristici, l'uso di regioni non codificanti del cpDNA si è incrementato velocemente, ed ora è impiegato ordinariamente per gli studi di filogenesi ai livelli intergenerici ed interspecifici (Shaw *et al.*, 2005).

Benché molte regioni non codificanti siano state esplorate da differenti ricercatori (per esempio, Taberlet *et al.*, 1991; Johnson & Soltis, 1994) la gran parte degli studiosi continua ad utilizzare un numero limitato di regioni spaziatrici non codificanti negli studi di sistematica molecolare perché maggiormente funzionali.

Caratteristiche che rendono il DNA plastidiale idoneo per le analisi filogenetiche sono le ridotte dimensioni, l'ereditarietà uniparentale, l'assenza di proteine istoniche complessate. tuttavia esistono anche una serie di fattori che rendono svantaggioso l'utilizzo del DNA plastidiale. Sicuramente tra gli svantaggi va annoverato il basso (Wolfe *et al.* 1987) e differenziale tasso mutazionale (Palmer, 1985; 1991; Downie & Palmer, 1992) che non permette la discriminazione tra popolazioni che si siano separate solo recentemente. Tanto più che è stato chiaramente dimostrato che l'utilità filogenetica delle differenti regioni non codificanti del cpDNA, all'interno di un dato gruppo tassonomico, può variare notevolmente (Sang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000; Cronn *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2003). Questi dati spesso rendono difficile la scelta della regione del cpDNA adatta per la ricerca filogenetica, anche a causa della scarsità di informazioni sul tempo relativo di separazione fra regioni differenti non codificanti.

Ancora, l'impiego del cpDNA rappresenta uno svantaggio per i possibili eventi di trasferimento del genoma da una specie all'altra per introgressione (Harris & Ingram, 1991; Riesenberg & Soltis, 1991). L'introgressione è il trasferimento di materiale genetico da una specie ad un'altra solo parzialmente iso-

lata dalla prima, attraverso l'ibridazione interspecifica ed il ripetuto reincrocio ad una specie parentale. Tale fenomeno può verificarsi anche nel genoma nucleare; tuttavia, l'ereditarietà uniparentale del genoma plastidiale fa sì che in esso vi sia un aumento del tasso di fissazione per deriva genetica e di conseguenza una diminuzione della diversità genetica attesa. Questo implica che la probabilità di mantenere due cpDNA differenti all'interno di una popolazione per un lungo periodo sia molto minore rispetto a quella dei geni nucleari; pertanto, la possibilità di rilevare e interpretare correttamente casi di introgressione è notevolmente ridotta (Rieseberg & Soltis, 1991). Diversi studi hanno evidenziato introgressione plastidiale senza concomitante introgressione nucleare; raramente è stata rilevata la situazione inversa (Wendel & Doyle, 1998). Pertanto i marcatori plastidiali sono solitamente accoppiati con altri dati di sequenza, inerenti al cpDNA o al DNA nucleare (Sang *et al.*, 1997; Santalla *et al.*, 1998; Azuma *et al.*, 2001; Bortiri *et al.*, 2001; Soltis *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2002; Nyffeler, 2002; Schonenberger & Conti, 2003).

Spaziatore intergenico *psbA-trnH*

Lo spaziatore intergenico *psbA-trnH*, adiacente al gene *psbA* coinvolto nella fotosintesi, è una delle regioni maggiormente variabili nel genoma plastidiale delle angiosperme (Storchova & Olson, 2007). Questa regione comprende, nella sua struttura, due diverse porzioni con tassi evolutivi differenti: una evolutivamente conservata ossia la regione 3'UTR *psbA*, che è una regione non tradotta ma sottoposta a notevole pressione selettiva perchè fondamentale nella regolazione post trascrizionale del gene *psbA*; ed una seconda maggiormente variabile ovvero lo spaziatore intergenico non trascritto *psbA-trnH*. Per la sua elevata variabilità questo spaziatore sembra essere un buon candidato come DNA barcoding nelle piante (Kress *et al.*, 2005; Storchova & Olson, 2007; Shneyer, 2009). Nelle angiosperme la lunghezza della regione oscilla tra 200 e 500 bp; da dati di letteratura per il genere *Cirsium*, la lunghezza va da 380 a 500 bp. Tale regione intergenica *psbA-trnH* è stata ampiamente utilizzata per risalire alle relazioni filogenetiche a livello inter- e infragenerico nell'ambito delle fanerogame (Kim *et al.*, 1999; Azuma *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2003).

Introne *rps16*

L'introne *rps16* è una porzione non codificante del gene che codifica per la proteina ribosomale S16 (Neuhaus *et al.*, 1989). Tale locus evolve molto rapidamente, pertanto accumula numerose mutazioni di lunghezza (Zurawski & Clegg, 1987), essa infatti varia da 707 a 951 bp (Oxelman *et al.*, 1997). Nelle Cichorioideae la lunghezza oscilla tra 781 a 820 bp (Howis *et al.*, 2009). Non tutte le piante presentano il gene *rps16*. Tra le specie in cui è assente vi sono *Marchantia polymorpha* L. (Ohyama *et al.*, 1986), *Pinus thunbergii* Parl. (Tsudzuki *et al.*, 1992), *Pisum sativum* L. (Nagano *et al.*, 1991) e *Epifagus virginiana* (L.) Bart. (Wolfe *et al.*, 1992), oltre a rappresentanti di numerose altre famiglie di fanerogame (Downie & Palmer, 1992; Doyle *et al.*, 1995). Ciò preclude il suo utilizzo in studi comparativi. L'introne *rps16* è un introne appartenente al gruppo II, ovvero, esso viene eliminato dal trascritto mediante una serie di reazioni autocatalizzate (Michel *et al.*, 1989). Inoltre, esso presenta come molti altri introni del II gruppo una struttura secondaria molto conservata ed è composto da sei domini (Michel *et al.*, 1989). I domini V, VI e parte del I evolvono più lentamente, in quanto coinvolti nella corretta elaborazione del trascritto (Learn *et al.*, 1992). Al contrario, i domini II e III sono poco conservati e ciò suggerisce che non siano indispensabili nell'espletamento della funzione dell'introne.

Spaziatore intergenico *trnC-ycf6*

La regione plastidiale $trnC^{GCA}-trnD^{GUC}$ si trova nella grande regione del genoma plastidiale a singola copia (LSC) ed è stata individuata come una regione ad elevato tasso evolutivo (Shaw *et al.*, 2005). Essa varia notevolmente in lunghezza con un range di oscillazione compreso tra 1726 e 3460 bp (Shaw *et al.*, 2005), presentando una lunghezza media di 2860 bp. Wakasugi *et al.* (1998) hanno dimostrato che questa regione è lunga circa 3000 bp in *Nicotiana* ed include i geni *ycf6* e *psbM*, rispettivamente lunghi 90 e 105 bp (Shaw *et al.*, 2005); pertanto essa comprende tre regioni spaziatrici intergeniche: lo spaziatore *trnC-ycf6*, mediamente lungo 690 bp ma con un range di variabilità compreso 246 e 1071 bp; lo spaziatore *ycf6-psbM* mediamente lungo 825 bp, ma anch'esso oscillante tra 406 e 1283 bp, e lo spaziatore *psbM-trnD* lungo mediamente 965 bp ma oscillante fra 506 e 1801 bp. Tutte queste regioni sembrano essere inclini a grandi delezioni (Shaw *et al.*, 2005).

La regione plastidiale $trnC^{GCA}-trnD^{GUC}$ è stata spesso utilizzata per studi filogenetici a partire dagli studi pionieristici di Demesure *et al.*, (1995) che ne hanno riportato una lunghezza di circa 3000 bp in *Quercus* (Fagaceae). Demesure *et al.*, (1996) che, successivamente, la utilizzarono in uno studio filogenetico con PCR-RFLP in *Fagus* (Fagaceae). Anche Mes *et al.*, (1997) nel loro studio di PCR-RFLP riguardante le relazioni interspecifiche in *Allium* (Alliaceae), usarono la regione *trnC-trnD*. Sequenze di questa regione sono state infine, utilizzate per valutare relazioni infrageneriche in *Humulus* (Cannabaceae) (A. Murakami, Kirin Brewery Company, Ltd., dati non pubblicati) e *Panax* (Araliaceae) (Lee & Wen, 2004). La regione non codificante *trnC-ycf6* (Shaw *et al.*, 2005) è lo spaziatore compreso tra i geni

plastidiali *trnC*, codificante per il *trnA* mitocondriale per l'anticodone della cisteina GCA, ed il gene *ycf6* subunità del complesso b6f del citocromo, che svolge un ruolo fondamentale nell'assemblaggio del complesso e/o nella stabilità dello stesso, nonché potenzialmente responsabile della sintesi di un piccolo peptide idrofobico di solo 29 aminoacidi.

TECNICHE DI BIOLOGIA

MOLECOLARE UTILIZZATE

Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa basata sulla migrazione a diversa velocità di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido, per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso. Le particelle si spostano verso il catodo se hanno carica positiva e verso l'anodo se hanno carica negativa; nel primo caso il processo è detto catforesi, nel secondo anafresi.

La velocità di migrazione è influenzata da quattro principali fattori: campione (carica- peso molecolare-forma); supporto (agarosio-agar-acrilamide- cellulosa); tampone (composizione-ph-concentrazione); campo elettrico (voltaggio-resistenza-corrente).

Il DNA a pH 8 è carico negativamente a causa delle cariche presenti sui gruppi fosfato. La migrazione avviene, quindi, dal catodo (-) all'anodo (+) in funzione principalmente del peso molecolare.

Il peso molecolare di un frammento risulta essere un fattore decisivo per la velocità di migrazione: maggiore è il peso molecolare del frammento che stiamo analizzando, minore sarà la distanza percorsa da questo attraverso la fitta rete del gel di supporto.

Occorre considerare il gel come una rete di pori, attraverso cui le molecole di DNA o proteine o RNA devono passare per raggiungere il polo che le attira.

Le molecole più corte, ovvero più leggere, sono meno rallentate dai pori rispetto a quelle più lunghe, ovvero più pesanti.

Più grossa è la molecola, maggiore sarà l'attrito (forze frizionali) contro le maglie del gel.

La relazione che esiste fra peso molecolare e velocità di migrazione non è lineare, ma inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare (vale a dire la lunghezza dei frammenti): $V_m/\log P$.

Tuttavia se due molecole hanno lo stesso peso molecolare è possibile separarle sfruttando la forma delle stesse in modo tale da ottenere velocità di migrazione. Un gel allo 0,8% rappresenta la tessitura ideale per separare e, soprattutto, valutare qualitativamente e quantitativamente materiale genomico ossia DNA ottenuto da un'estrazione.

Un gel al 1,5-2% ha, invece, la tessitura ottimale per separare corti segmenti di DNA quali frammenti plastidiali ed ISSR.

La preparazione di un supporto d'agarosio implica sempre l'uso di una sostanza capace di far "rilevare" i frammenti di DNA sul gel.

Tale sostanza generalmente è il bromuro di etidio (EtBr), un agente intercalante in grado di scivolare fra le coppie di basi del DNA; una sostanza fluorescente capace, quindi, di assorbire radiazioni a bassa lunghezza d'onda (λ) quali i raggi U.V. (260-360 nm) e di riemetterli con una lunghezza d'onda maggiore percepibile questa volta dal nostro sistema ottico.

La fluorescenza prodotta è giallo-arancio.

Il tampone ha la duplice funzione di rendere possibile il passaggio della corrente e di mantenere costante il pH durante il processo elettroforetico, condizione necessaria per evitare un'imprevista variazione nella carica del frammento e quindi una variazione non controllabile della sua mobilità. Il tampone usato è, solitamente, il TBE 1X.

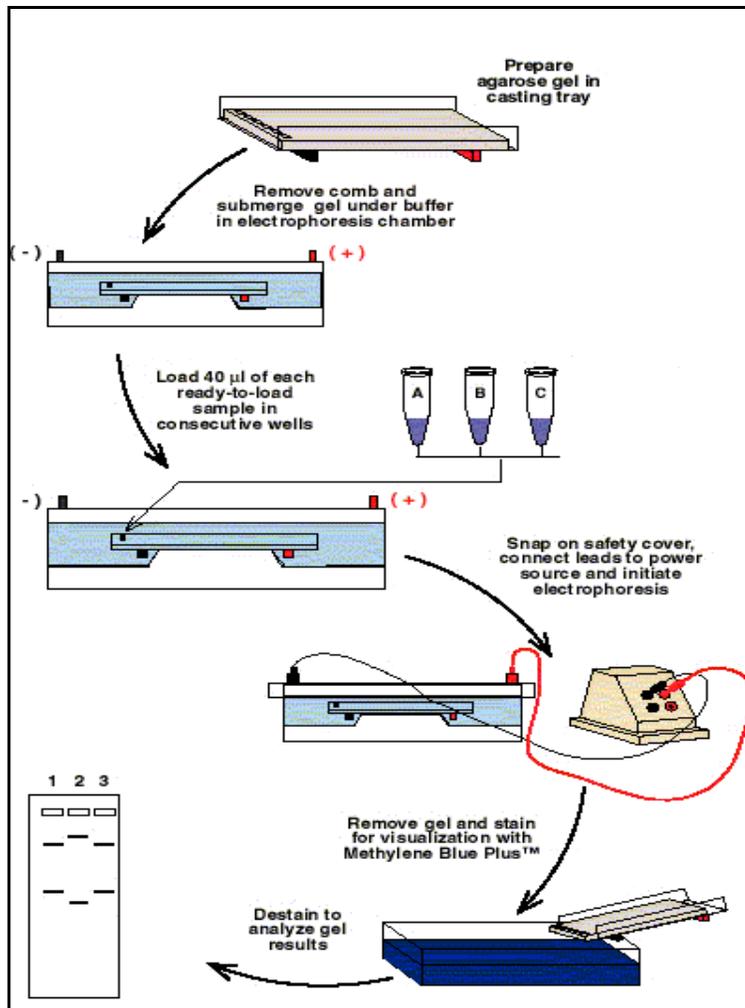


Fig.15: Schematizzazione di una corsa elettroforetica

PCR (reazione a catena della polimerasi)

La reazione a catena della polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction) è un metodo di amplificazione in vitro di sequenze specifiche di acidi nucleici. La PCR ha rivoluzionato l'approccio a molti problemi di natura biologica (Mullis *et al.*, 1986; Mullis *et al.*, 1987; Mullis, 1990).

L'enorme significato di questa scoperta è stato riconosciuto con l'assegnazione, nel 1993, del premio Nobel per la chimica a Mullis.

La PCR si basa sul principio della replicazione semiconservativa del DNA ed il risultato di questo processo è la formazione di due molecole figlie di DNA a doppia elica, identiche tra loro e composte da un filamento parentale e da un filamento di DNA complementare di nuova sintesi, partendo da un'unica sequenza di DNA.

Per ottenere questi risultati gli step della PCR sono i seguenti: denaturazione al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato, appaiamento (annealing) di coppie di oligonucleotidi di sequenza specifica (primer) scelti in modo da essere omologhi a sequenze che si trovano all'interno dello stampo di DNA e allungamento da parte della DNA polimerasi a partire dai primer, per copiare lo stampo di DNA. Nella reazione devono essere presenti i nucleotidi (dNTP) e tutti gli altri elementi di una reazione di polimerasi.

Questi tre passaggi sono ripetuti molte volte al fine di amplificare lo stampo di DNA e il numero di molecole di DNA raddoppia in maniera esponenziale ad ogni ciclo, ottenendo alla fine milioni di copie dello stampo.

Nei primi esperimenti di PCR è stata utilizzata la DNA polimerasi I di *Escherichia coli* che doveva essere aggiunta alla reazione dopo ogni denaturazione poiché termolabile.

In seguito, l'amplificazione in vitro del DNA è stata resa molto più efficiente dalla scoperta di polimerasi stabili al calore come la Taq polimerasi del *Thermophilus aquaticus*.

La PCR è una tecnica molto sensibile che permette l'amplificazione di frammenti di DNA anche da un numero molto basso di molecole; tuttavia questa caratteristica la rende molto sensibile alle contaminazioni. Un altro potenziale svantaggio è costituito dal fatto che è necessario avere determinate informazione sulla sequenza del tratto che si desidera amplificare per poter disporre dei primer specifici.

Naturalmente i primer, forward e reverse, oltre a presentare le stesse caratteristiche chimico-fisiche, non devono presentare sequenze omologhe fra loro, altrimenti si possono generare dei dimeri o strutture secondarie nello stesso oligonucleotide.

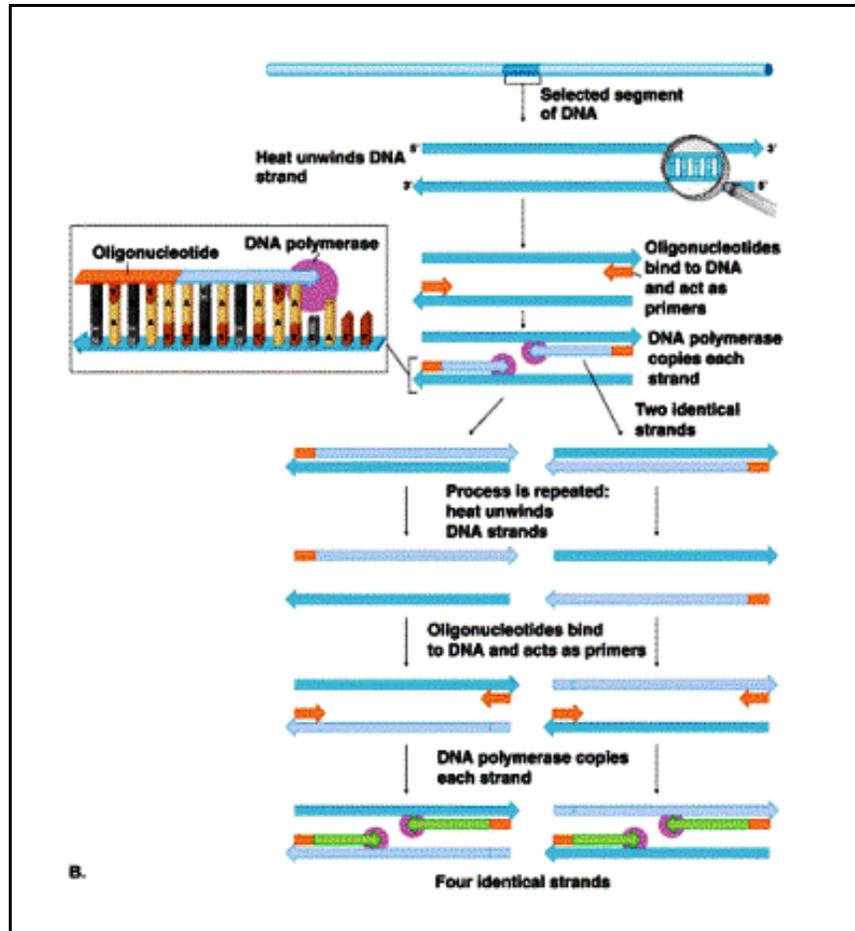


Fig.16: Schematizzazione di un processo di PCR.

Clonaggio

Il clonaggio, sviluppato all'inizio degli anni Settanta, prevede l'isolamento e la purificazione del frammento di DNA di interesse con successiva digestione mediante enzimi di restrizione di tipo II. Questi enzimi tagliano il DNA all'interno della stessa sequenza di riconoscimento ed il taglio può avvenire in punti sfalsati (estremità adesive) oppure su entrambe le eliche del DNA a livello dei legami fosfodiesterici opposti (estremità piatte). Una volta isolato il frammento di DNA desiderato, questo viene unito ad una molecola autoreplicante di DNA, il vettore di clonaggio attraverso il processo definito ligazione. L'enzima, isolato dal batteriofago T4 e perciò detto T4 DNA ligasi, forma legami covalenti tra il gruppo fosfato 5' di un'estremità e il gruppo ossidrilico 3' della catena adiacente. I vettori utilizzati per il clonaggio, che possono essere plasmidi, fagi, cosmidi o cromosomi artificiali e ogni vettore presenta un'origine di replicazione, marcatori genetici e regioni del DNA non essenziali per la propagazione nella cellula ospite che possono essere sostituite o interrotte dall'inserzione di DNA esterno. In particolare, i plasmidi possono essere introdotti nell'organismo ospite attraverso il processo di trasformazione e sono caratterizzati dal possedere un marcatore selettivo che solitamente è un gene che conferisce alla cellula ospite la resistenza ad uno o più antibiotici (es. tetraciclina, ampicillina). Il plasmide è linearizzato per consentire l'inserimento del frammento di DNA, e poi richiuso a formare nuovamente una struttura circolare. La presenza dell'inserito può essere rivelata dalla perdita di resistenza per un antibiotico, processo noto come inattivazione inserzionale. L'inserimento del frammento di DNA nel vettore comporta la replicazione della molecola di DNA ricombinante ottenuta in un'appropriata cellula ospite. Il risultato è l'amplificazione selettiva *in vivo* di quel determinato frammento di DNA. Al termine della trasformazione le cellule vengono piastrate su un terre-

no contenente un antibiotico. Le colonie cresciute sulle piastre saranno quelle derivate dalle cellule contenenti il plasmide. I metodi di clonaggio per prodotti della PCR sono molto simili a quelli indicati per frammenti ottenuti secondo le procedure convenzionali di manipolazione del DNA. Infatti si basano sul clonaggio di frammenti con estremità piatte o con estremità coesive. La maggior parte delle polimerasi termostabili, utilizzate nella PCR, possiedono una debole attività di tipo terminal transferasica aggiungendo un residuo di adenosina (dA) alle estremità 3' dei propri prodotti di amplificazione. Sebbene questa caratteristica ostacoli il clonaggio dei prodotti PCR, è stata vantaggiosamente sfruttata in una serie di vettori commerciali denominati T/A. Questi vettori vengono linearizzati e posseggono un residuo di timina (dT) alle loro estremità 3'. I residui in 3' dT presenti sul vettore si appaiano con i residui in 5' dA dei prodotti di amplificazione rendendone possibile il clonaggio. Questo metodo ha il vantaggio di non necessitare di purificazioni del prodotto PCR né di trattamenti post PCR con enzimi di modificazione o restrizione. Quando il clonaggio è condotto con DNA polimerasi termostabili che non hanno funzione terminal transferasica, come ad esempio quelle ad alta fedeltà di amplificazione perché dotate di funzione di correzione di bozze (*proofreading*), si preferisce effettuare il clonaggio *blunt-end*. Nelle situazioni in cui si utilizza la Taq polimerasi, i prodotti possono essere clonati in vettori *blunt* facendo precedere al clonaggio il trattamento con enzimi dotati di attività 3'-5' esonucleasica. Una variante del clonaggio *blunt-end* prevede la presenza di vettori appositamente progettati (es. pJET1.2/blunt) contenenti un gene letale mutante che viene scisso nella fase di ligazione con l'inserto di DNA con conseguente perdita di funzione. Come risultato, solo i ricombinanti positivi crescono dopo trasformazione, mentre le cellule con il gene letale non ricombinante muoiono.

Sequenziamento automatico

Il sequenziamento è una tecnica che permette la lettura di intere sequenze nucleotidiche di frammenti purificati di DNA.

Il sequenziamento avviene secondo il metodo di Sanger *et al.* (1977) anche detto metodo per terminazione di catena.

Il protocollo di tale metodica prevede, per ciascun frammento da sequenziare, 4 differenti reazioni con DNA a singola elica a cui si associa un primer, i 4 precursori normali del DNA (dNTP), l'enzima DNA polimerasi, ed uno di quattro dideossinucleotide (ddNTP), marcato con radionuclidi; occorre allestire 4 reazioni perché non c'è modo di distinguere un nucleotide marcato dall'altro e pertanto, occorre considerarli separatamente.

Per analizzare i prodotti finali delle quattro reazioni, i campioni vengono caricati in quattro pozzetti dello stesso gel a cui si applica una elevata ddp, al fine di ottenere la migrazione di tutti i frammenti ottenuti.

In seguito si interrompe la corsa elettroforetica e si pone a contatto con il gel una lastra radiografica su cui sarà poi possibile visualizzare i frammenti radioattivi; confrontando la migrazione delle bande nelle quattro corsie si potrà leggere la sequenza, ovviamente partendo dalle bande maggiormente distanti dai pozzetti di carica.

Data la necessita di separare bande che differiscono anche di un solo nucleotide, per la corsa elettroforetica viene utilizzato un sottilissimo gel di acrilamide ad elevato potere risolutivo.

La modifica del protocollo originale, applicata oggi nel sequenziamento automatico consiste nella marcatura dei ddNTP con fluorocromi di colore diverso per ogni singolo nucleotide. Ogni volta che un ddNTP è incorporato in una catena nascente di un acido nucleico, la polimerizzazione si arresta.

In questo caso i ddNTP sono distinguibili in base al diverso colore, per cui è possibile effettuare una singola reazione. Si tratta di una marcatura terminale non radioattiva che permette di distinguere i prodotti delle quattro reazioni.

Alla fine della reazione i prodotti sono mischiati in un'unica miscela di reazione. Ogni specifica lunghezza d'onda di fluorescenza viene, poi, identificata da un detector in seguito all'emissione di un raggio laser di Argon, infatti, la tecnica non prevede l'allestimento del gel di sequenza in quanto sfrutta il principio dell'elettroforesi capillare: la separazione delle molecole di DNA è effettuata in un tubo con diametro interno estremamente piccolo.

Per la separazione è applicato un alto voltaggio tra le 2 estremità del capillare e la migrazione elettroforetica provoca il movimento delle molecole nella soluzione.

In prossimità del catodo le molecole attraversano una finestra all'interno della quale sono rilevate da un raggio. Il segnale è inviato ad un registratore e quindi ad un computer.

Le lunghezze d'onda emesse sono elaborate da un computer che le converte in un elettroferogramma (Fig. 17) che viene, in seguito, interpretato mediante l'utilizzo di specifici software.

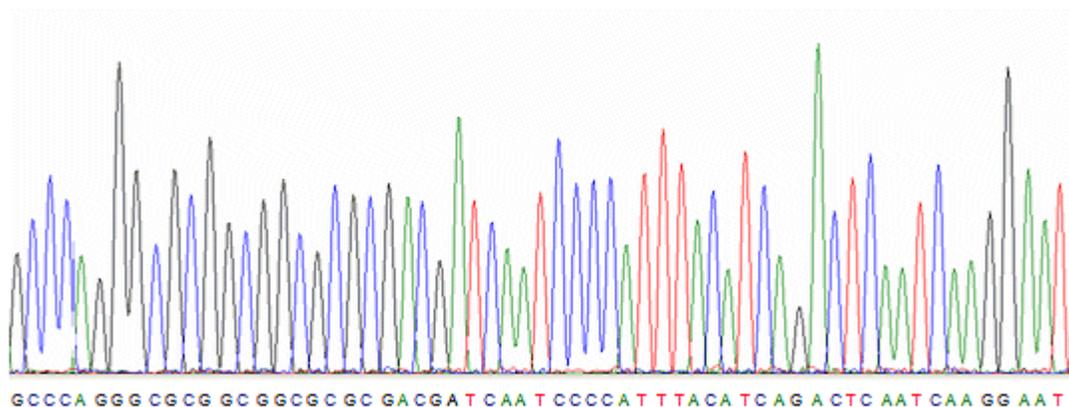


Fig.17: Elettroferogramma

MATERIALI E METODI

Specie studiate e loro distribuzione

Le specie impiegate nello studio sono 28, tutte appartenenti alla sez. *Eriolepis*:

- *Cirsium ferox* (L.) DC. in Lam & DC.
- *C. vallis-demoniis* Lojac.
- *C. tenoreanum* Petrak
- *C. lobelii* Ten.
- *C. morisianum* Reichenb.fil.
- *C. eriophorum* (L.) Scop.
- *C. spathulatum* (Moretti) Gaudin
- *C. scabrum* (Poiret) Bonnet & Barratte
- *C. echinatum* (Desf.) DC. in Lam. & DC.
- *C. vulgare* (Savi) Ten.
- *C. italicum* (Savi) DC.
- *C. heldreichii* Halacsy
- *C. bulgaricum* DC.
- *C. polycephalum* DC.
- *C. morinifolium* Boiss. & Heldr. In Boiss
- *C. hypopsilum* Boiss. & Heldr. In Boiss
- *C. richteranum* Gillot
- *C. costae* (Sennen & Pau) Petrak
- *C. giraudiasii* Sennen & Pau

- *C. odontolepis* Boiss. ex DC.
- *C. ligulare* Boiss.
- *C. grecescui* Rouy
- *C. decussatum* Janka
- *C. boujartii* (Piller & Mitterp.) Shultz Bip.
- *C. furiens* Griseb. & Schenk
- *C. ciliatum* Moench
- *C. serrulatum* (Bieb.) Fischer
- *C. laniflorum* (Bieb.) Fischer
- *C. lacaitae* Petrak

Dallo studio è stata esclusa la specie *Cirsium spathulatum* (Moretti) Gaudin perchè considerata una sottospecie di *C. eriophorum*. Delle 28 specie campionate *C. lacaitae*, *C. vallis-demoniis*, *C. tenoreanum* e *C. lobelii* presentano areale di distribuzione esclusivamente in Italia; *C. eriophorum*, *C. italicum* e *C. vulgare* appaiono distribuite in tutta l'Europa; *C. costae*, *C. richterianum*, *C. giraudiasii*, *C. odontolepis*, *C. echinatum*, *C. ferox*, *C. morisianum* e *C. scabrum* presentano areale di distribuzione nella penisola iberica ma con *C. ferox*, *C. morisianum* e *C. scabrum* presenti anche nel centro-nord Italia. *C. echinatum*, il cui attuale areale di distribuzione è localizzato nelle regioni più ad ovest del Mediterraneo, è stato in passato segnalato anche in Sicilia ma non più ritrovato. *C. morinifolium* è endemico dell'isola di Creta; *C. heldreichii* e *C. hypopsilum* entrambi distribuiti sulle montagne della Grecia; *C. bulgaricum*, *C. laniflorum* e *C. polycephalum* diffusi sulle coste del Mar Nero ed in Turchia; infine, *C. ligulare*, *C. grecescui*, *C. decussatum*, *C. boujartii*, *C. ciliatum*, *C. furiens* e *C. serratum* sono diffusi nella penisola balcanica con areali più

o meno simpatrici. *Cirsium palustre* (L.) Scop., appartenente alla sezione *Cirsium* del medesimo genere, è stato considerato nell'analisi come outgroup della sezione *Eriolepis*. E' stata inoltre inclusa nello studio la specie *Picnomon acarna* (L.) Cass., unico rappresentante del genere *Picnomon* Adanson, un genere molto affine al genere *Cirsium*.

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato in campo laddove possibile; mentre si è provveduto ad un campionamento non distruttivo da materiale d'erbario per le specie di cui non è stato possibile procedere al campionamento diretto.

Nel primo caso gli individui sono stati raccolti ad almeno ad un metro di distanza l'uno dall'altro per evitare il rischio che due individui campionati a poca distanza potessero essere cloni derivanti da una stessa pianta madre.

In laboratorio si è dapprima proceduto alla identificazione della specie, quindi alla realizzazione di un campione d'erbario per ciascuna specie raccolta in campo.

Anche i campioni d'erbario da cui è stata prelevata una piccola quantità di materiale sono stati dapprima reidentificati.

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da campioni freschi seguendo la metodica CTAB di Doyle & Doyle (1987, modificato).

Una quantità pari a 0,5-1,5g di tessuto vegetale fresco proveniente dalle foglie è stato selezionato, prelevato e poi pestato con sabbia di silice in tubi di plastica Eppendorf da 2 mL. Si è poi aggiunto al campione di 1 mL di tampone di lisi CTAB 2X (N-cetil-N,N,N-trimetilammonio bromuro) e di un agente ridu-

cente, il β -mercaptoetanolo (50 μ L), che spezza i ponti disolfuro responsabili del mantenimento della struttura delle proteine. Il tampone contiene sali come NaCl, Tris-HCl ed EDTA, un agente chelante per gli ioni Mg^{2+} e Ca^{2+} utilizzato per inibire le attività Dnasiche mentre il β -mercaptoetanolo ha la funzione di inibire le perossidasi e le polifenolossidasi nonchè di mantenere un ambiente riducente.

La miscela così preparata è stata incubata a 60°C per 30 minuti e trasferita su ghiaccio per 5 minuti, al fine di ottenere la rottura cellulare mediante shock termico; sono stati aggiunti 500 μ L di cloroformio/alcol isoamilico (24:1), quindi si è proceduto ad una centrifugazione a 10.000 rpm per 10 minuti, per rimuovere i residui delle pareti cellulari e le proteine, con successivo recupero della fase acquosa superiore. L'operazione si è ripetuta per altre 2 volte e, l'ultimo trasferimento è stato effettuato in tubi Eppendorf da 1,5 mL.

Si è poi aggiunto isopropanolo freddo (70% V/V) con un successivo trasferimento a -20°C per 30 minuti per favorire la precipitazione del DNA; quindi si è concluso questo step con una centrifugazione a freddo (4°C) per 30 minuti a 13.200 rpm. L'isopropanolo ha la capacità, conferitagli dai gruppi OH, di formare legami idrogeno con l'acqua, determinando così la precipitazione del DNA, dopo centrifugazione, si troverà sul fondo del tubo.

Sono stati effettuati due lavaggi con 800 μ L di etanolo al 70% seguiti da centrifugazione a freddo per 10 minuti a 13.200 rpm; dopo ogni lavaggio è stato possibile vedere, in fondo al tubo, il pellet di DNA che si è andato purificando con i lavaggi.

Infine il pellet di DNA è stato asciugato dell'etanolo rimasto mediante l'utilizzo di una centrifuga a vuoto quindi risospeso in 50 μ L di acqua distillata sterile.

Per i campioni provenienti da materiale d'erbario si è invece utilizzato un kit Qiagen di estrazione del DNA con un protocollo opportunamente modificato, al fine di ottimizzare l'estrazione e la qualità del prodotto finale. Per valutare integrità e concentrazione del DNA estratto, a questo punto, è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% in Tris-Borato-EDTA (TBE) con l'aggiunta di 1/100.000 del volume di Bromuro di Etidio (10 mg/mL). Effettuata l'elettroforesi, il gel è stato osservato al transilluminatore (UV) e fotografato.

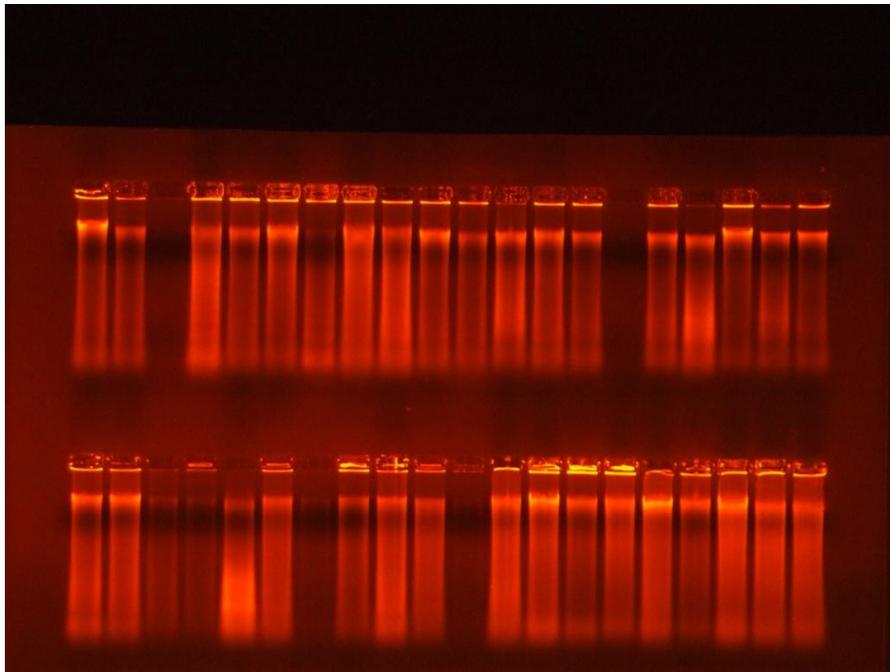


Fig.18: DNA genomico visualizzato su gel di agarosio

Amplificazione dei marcatori molecolari multicopia

Partendo dal DNA genomico in soluzione acquosa sono state effettuate una serie di amplificazioni tramite PCR al fine di ottenere prodotti variabili di interesse.

Le reazioni di PCR sono state così allestite:

40 ng di DNA (1 μ L)

Buffer 1X nella proporzione di 1/10 del volume finale

0,875 µL MgCl₂ (25 mM)

2 µL dNTPs (25 mM)

0,5 µL Primer (50 mM)

0,5 µL Taq polimerasi (2,5 UE)

H₂O q.b. a 25 µL di volume finale

I marcatori analizzati, sono stati amplificati utilizzando le seguenti coppie di primer appositamente disegnati a partire da sequenze di letteratura:

ITS1 (Aceto *et al.*, 1999):

JK14: 5'-GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG-3'

JK11: 5'-ATCCTGGAATTCACAACCAAGTATCG-3'

ITS2 (Aceto *et al.*, 1999):

JK27: 5'-TTGGAGAATCCCGTGAACCATCG-3'

SN3: 5'-CCAAACAACCCGACTCGTAGACAGC-3'

ETS:

ETS_{scar-1}: 5'-TTCGTATCGTTCGGT-3' (Kelch & Baldwin, 2003)

18S ETS: 5'-ACTTACACATGCATGATG-3' (Baldwin & Markos, 1998).

psbA-trnH:

psbA: 5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3' (Hamilton, 1999)

trnH^(GUG): 5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3' (Demesure *et al.*, 1995)

trnC-ycf6 (Shaw *et al.*, 2005, modificato da Demesure *et al.*, 1995):

trnC^{GCA}F: 5'-CCA GTT CRA ATC YGG GTG-3'

ycf6R: 5'-GCC CAA GCR AGA CTT ACT ATA TCC AT-3'

rps16 (Oxelman *et al.*, 1997):

rpsF: 5'-GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT-3'

rpsR: 5'-TCG GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC-3'

Le reazioni, effettuate in apparecchi Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 e 9700, hanno previsto:

- per i marcatori ITS e per lo spaziatore *trnC-ycf6*, un ciclo di denaturazione a 95°C per 45 secondi, un ciclo di annealing a 60°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione a 72°C per 1 minuto e 30 secondi, per 30 volte;
- per i marcatori dello spaziatore *psbA-trnH* e per l'introne *rps16*, un ciclo di denaturazione a 94°C per 30 secondi, un ciclo di annealing a 55°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione a 72°C per 1 minuto, per 35 volte;

In tutti i diversi protocolli di amplificazione i campioni sono stati denaturati per 6 minuti a 95°C prima dell'inizio del primo ciclo e il tempo di estensione è stato prolungato di 7 minuti alla fine dell'ultimo ciclo.

Anche in questo caso i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio (1.5%) insieme ad un marcatore di peso molecolare noto, per valutarne la concentrazione e le dimensioni. Dall'analisi visiva dei frammenti, sono stati scelti i prodotti da purificare e sequenziare.

Clonaggio dei prodotti della PCR

I prodotti della PCR ottenuti dall'amplificazione del marcatore nucleare ETS sono stati di seguito clonati allo scopo di ottenere una maggiore risoluzione nel successivo sequenziamento. La loro analisi ha permesso di discriminare le mutazioni presenti in tutte le sequenze da quelle che si verificano solo occasio-

nalmente in uno o pochi cloni. La clonazione dei prodotti di PCR è stata eseguita utilizzando il CloneJet PCR Cloning Kit (Fermentas) che sfrutta come vettore il plasmide pJET1.2/blunt Cloning Vector. Quest'ultimo è un vettore di clonaggio linearizzato che accetta inserti da 6 bp a 10 kb ed è caratterizzato dall'estremità 5' fosforilata, pertanto non è richiesta la fosforilazione dei primer PCR.

La fase di blunting, necessaria per i prodotti PCR con estremità coesive, ha previsto:

- prodotto PCR circa 30ng (1 μ l);
- DNA blunting enzyme 1 μ l;
- 2X Reaction Buffer 10 μ l;
- H₂O q.b. fino al raggiungimento del volume finale di 20 μ l.

La miscela è stata incubata a 70°C per 5 minuti e successivamente raffreddata brevemente in ghiaccio. La reazione di ligazione ha previsto l'aggiunta al prodotto di

- pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/ μ l) 1 μ l;
- T4 DNA ligasi 1 μ l.

Successivamente la miscela di ligazione è stata incubata a temperatura ambiente (22°C) per 30 minuti e mantenuta a -20°C fino al momento della trasformazione.

Per la trasformazione, come cellule competenti, sono stati utilizzati ceppi di *E. coli DH5 Alpha*. In questa fase, effettuata in ghiaccio, per ogni 10 μ l di prodotto di ligasi è stata aggiunta un'aliquota di cellule competenti pari a 100 μ l secondo un rapporto 1:10. Al termine dell'operazione la miscela è stata lasciata in ghiaccio per 15 minuti, per poi essere incubata a 42°C per 1 minuto

e posta in ghiaccio per 2 minuti, al fine di ottenere lo shock termico necessario a garantire la permeabilizzazione della membrana batterica e l'ingresso del plasmide. Successivamente sono stati aggiunti 400 μ l di terreno di coltura complesso liquido *Luria Broth* (LB) (in rapporto 1:4 con le cellule competenti) e la soluzione è stata posta in agitazione a 37°C per 45 minuti per poi essere centrifugata a 4000 rpm per 4 minuti. Al termine è stato tolto parte del surnatante (ca. 100 μ l) e risospeso il pellet. La miscela è stata piastrata su un terreno di coltura solido, LB con agar, contenente ampicillina (60 μ l) per poi essere incubata a 37°C (12 h circa). Solo nel primo clonaggio sono state utilizzate le quantità previste dal protocollo, mentre nei successivi cinque sono state dimezzate mantenendo comunque una resa elevata.

Per l'analisi dei cloni ricombinanti ci si è avvalsi della procedura colony PCR che ha previsto il trasferimento delle colonie in una miscela di reazione composta da:

- 10X Taq buffer 2,5 μ l;
- MgCl₂ 25 mM (0,875 μ l);
- dNTPs 2,0 mM (2,0 μ l);
- forward primer 10 μ M (0,25 μ l);
- reverse primer 10 μ M (0,25 μ l);
- Taq DNA polimerasi 5 U/ μ l (1 μ l);
- H₂O q.b. fino al raggiungimento del volume finale di 25 μ l.

La miscela di reazione è stata caricata nel termociclatore Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2700 eseguendo per prima una fase di denaturazione 95°C per 3 minuti, poi procedendo secondo il seguente schema per i successivi 30 cicli: -denaturazione a 94°C per 30 secondi;

- annealing a 60°C per 30 secondi;
- estensione a 72°C per 1 minuto.

Il tempo di estensione è stato prolungato di 3 minuti alla fine dell'ultimo ciclo.

I primer utilizzati per l'amplificazione dell'insero sono stati:

pJET1.2 forward sequencing primer:

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

pJET1.2 reverse sequencing primer:

5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

I prodotti dell'amplificazione sono stati poi sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5% in TBE 0,5X con aggiunta di bromuro di etidio (10 mg/ml). Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato al transilluminatore al fine di valutare la concentrazione del prodotto di amplificazione.

Purificazione delle bande

I frammenti di PCR sono successivamente purificati mediante il GE Healthcare GFX PCR DNA and Gel band Purification Kit. Il protocollo del kit prevede:

- aggiunta di 500 µL di tampone (capture Buffer / Buffer 1) al campione, per far legare il DNA alla membrana di vetro, e centrifugazione a 11.000 rpm per 1 minuto;
- aggiunta di 500 µL di Wash Buffer (Buffer 2), contenente etanolo, e centrifugazione a 11.000 per 1 minuto;
- centrifuga senza aggiunta di reagenti per eliminare l'etanolo del Wash Buffer in eccesso;

- trasferimento della colonnina con all'interno il DNA in tubo Eppendorf da 1,5 mL ed eluizione del DNA con 30 μ L di acqua distillata sterile a seguito di una incubazione per 1 minuto e centrifugazione a 11.000 rpm della stessa durata.

Reazioni di sequenza

I frammenti purificati così come quelli clonati, riamplicati e purificati sono stati poi sottoposti ad una differente reazione di PCR seguita da una ulteriore purificazione e dal sequenziamento diretto. Questa volta però è stato amplificato una sola elica del tratto genico prescelto e quindi è stato usato uno solo dei due primer visti precedentemente. La reazione di sequenza è allestita nel modo seguente:

- 1 μ L di Buffer
- 100 ng di DNA (3 μ L da purificato)
- 0,75 μ L di primer 0,50 mM
- 0,5 μ L di Big Dye Taq polimerasi

Il Big Dye è una miscela contenente i dNTP, i didesossinucleotidi fluorocromati e la *Taq* polimerasi. Questo enzima è una forma mutante della *Taq* polimerasi vista nella precedente reazione, ed è privo dell'attività nucleasica 5'-3' e con una capacità di discriminare tra i dideossinucleotidi drasticamente ridotta.

Utilizzando gli apparecchi Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 e 9700, le condizioni per la reazione di sequenza sono state le seguenti:

96°C per 10 secondi;

50°C per 5 secondi;

60°C per 4 minuti;

per un totale di 25 cicli.

Il prodotto della reazione di sequenza è stato successivamente raccolto per precipitazione aggiungendo:

2,5 µL di 3 M Na-acetato pH 5.2

50 µL di etanolo assoluto

20 µL di acqua distillata sterile

La reazione è stata incubata a -20°C per 30 minuti;

quindi è stata effettuata una centrifugazione a 4°C per 30 minuti alla massima velocità.

Si sono effettuati poi 2 lavaggi con 150 µL di etanolo 70% freddo, centrifugando per 15 minuti; successivamente, il precipitato è stato asciugato favorendo l'allontanamento dell'etanolo residuo.

Ogni campione è stato risospeso in 13 µL di tampone di caricamento costituito da formammide: blu destrano in rapporto di 5:1, sciolti in EDTA 25 mM a pH 8.

I campioni sono stati denaturati a 90°C per 3 minuti prima del caricamento nel sequenziatore.

Analisi delle sequenze

Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute mediante amplificazione di marcatori nucleari e plastidiali con primer *forward* e *reverse*, sono stati dapprima editati con l'utilizzo di specifici programmi quindi, le sequenze derivanti sono state confrontate con quelle provenienti da banche dati per verificare l'attendibilità del lavoro svolto.

Sono state definite sequenze consenso per ciascuna specie esaminata, confrontando tutte le sequenze analoghe ottenute per la stessa specie da diversi campioni provenienti da popolazioni differenti. Le sequenze consenso sono state allineate mediante il software BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) che utilizza come

sottoprocesso il programma ClustalW (Thompson et al., 1994) lasciando i parametri di default del programma ClustalW, ovvero costo di apertura pari a 15 e costo di estensione pari a 6.66. Le sequenze maggiormente divergenti a causa dell'elevata frequenza di brevi inserzioni/delezioni sono state riallineate manualmente a seguito di una ispezione visiva. Per le analisi cladistiche è stato utilizzato il software Nona v.2.0 (Goloboff, 1998), impiegandolo come sottoprocesso del programma Winclada v.1.00.08 (Nixon, 1999). I parametri del software sono stati settati nel modo seguente: hold 10000 (massimo numero di cladogrammi a eguale parsimonia conservati in memoria); hold/ 100 (massimo numero di cladogrammi a eguale parsimonia conservati in memoria per ogni ripetizione dell'algoritmo di ricerca); mult* 100 (algoritmo di ricerca euristica con 100 ripetizioni); mult*max* attivato (branch swapping TBR approfondito sui cladogrammi ottenuti). I gap sono stati trattati come dati mancanti. È stata in seguito effettuata l'analisi di bootstrap (Felsenstein, 1985) in modo da ottenere stime di supporto per ciascun clado. I parametri settati sono i seguenti: numero di repliche pari a 100, mult* 10 (algoritmo di ricerca euristica con 10 ripetizioni), hold/ 100 (massimo numero di cladogrammi a uguale parsimonia conservati in memoria per ogni ripetizione dell'algoritmo di ricerca). È stata effettuata, a sostegno dei dati ottenuti dalla prima analisi cladistica, una seconda analisi mediante l'utilizzo del metodo dell'Implied weighting (Farris, 1969; Goloboff, 1993), che prevede l'attribuzione di un peso differente ai caratteri omoplastici a seconda del numero di passi aggiuntivi che essi generano. Per effettuare tale analisi ci si è avvalsi del software TNT (Goloboff et al., 2008), con parametri corrispondenti a quelli sopra indicati per il programma precedente. Infine è stata effettuata un'analisi bayesiana mediante l'utilizzo del programma Mr Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), ponendo il numero di generazioni a 20.000.000, impiegando una singola ripetizione dell'algoritmo,

con 4 catene parallele, stati in origine equiprobabili, tassi di mutazioni in partenza eguali, topologie tutte a priori equiprobabili e lunghezze dei rami non costrette.

Elenco delle sigle

CTAB	Bromuro di esadeciltrimetilammonio
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico, sale disodico
EtBr	Bromuro di etidio
BBF	Gel loading buffer
NaCl	Cloruro di sodio
TBE	Tris, EDTA, acido borico
TRIS	Idrossimetilamminometano

Soluzioni stock

BROMURO D'ETIDIO 10 mg/ml

CLOROFORMIO - ALCOL ISOAMILICO (24 : 1)

CTAB 2 X

Tris-HCl pH 8	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA pH 8	20 mM
CTAB	2 %
β -mercaptoetanolo	0.2 %

EDTA 0.5M

Sale disodico biidrato 186.12g

Portare a pH 8 con NaOH

Portare a volume finale 1 L con H₂O

FENOLO - CLOROFORMIO (1:1)

GEL LOADING BUFFER 10X

Blu bromofenolo	210 mg
Xilene cianolo	210 mg

Glicerolo 25 ml

Portare a volume finale 50 ml con H₂O

TBE 10X

Tris base 108 g

Acido Borico 55 g

EDTA 0.5 M pH 8 40 g

Portare a volume finale 1 L con H₂O

TRIS-HCl 1 M

Tris base 121.4 g

Portare a pH 8 con HCl 37 %

Portare a volume finale 1L con H₂O

RISULTATI

Sono stati effettuati allineamenti per ciascun marcatore, generando matrici di sequenze mediante l'utilizzo del software Bioedit v.7.0.9.0 (Hall, 1999). La lunghezza della matrice per il marcatore ITS1 è risultata di 322 caratteri con 42 caratteri informativi; per ITS2 la lunghezza della matrice ottenuta è stata di 293 caratteri con 25 caratteri informativi; per il marcatore ETS è stata realizzata una matrice con 24 taxa costituita da 525 caratteri di cui 64 caratteri informativi. Per i marcatori plastidiali, invece, l'allineamento dello spaziatore intergenico *psbA-trnH* ha prodotto una matrice di 481 caratteri, di cui solo 4 informativi; la matrice dell'introne *rps16* è risultata essere di 467 caratteri con 20 siti informativi, ed infine, la matrice derivante dall'amplificazione dello spaziatore *trnC-ycf6* è risultata essere di 544 caratteri di cui 46 informativi. E' stata inoltre costruita una matrice con sequenze di letteratura degli ITS 1 e 2 (se necessario, privandole della sequenza del 5.8S), cui sono state aggiunte le sequenze unite dei marcatori ITS1 e ITS2, provenienti dai campioni in analisi. Tale matrice consta di 153 taxa ed è lunga 606 caratteri con 268 caratteri informativi (Tab.1).

Le specie considerate in questa matrice sono tutte appartenenti alla sottotribù delle *Carduinae* (Cass.) Dumort. ad esclusione dell'outgroup *Saussurea acuminata* Turcz. ex DC., appartenente alla sottotribù delle *Echinopsinae* (Cass.) Dumort.

Marcatore utilizzato	Lunghezza matrice	N.caratteri informativi
ITS1	322	42
ITS2	293	25

ETS	525	64
<i>psbA-trnH</i>	481	4
<i>rps16</i>	467	20
<i>trnC-ycf6</i>	544	47
ITS da letteratura	606	268

Tab. 1 tabella riassuntiva delle matrici ottenute dai singoli allineamenti

Al fine di definire la monofilia della sezione *Eriolepis* nell'ambito del genere *Cirsium* è stata effettuata una analisi cladistica di tale matrice mediante l'utilizzo del programma Nona v.2.0 (Goloboff, 1998), impiegandolo come sottoprocesso del programma Winclada v.1.00.08 (Nixon, 1999). Ciò che si evince guardando il cladogramma di consenso di maggioranza (Fig. 18) è che non è possibile individuare un gruppo monofiletico che includa l'intera sezione *Eriolepis* e che non includa i generi *Notobasis* Cass., *Silibum* (L.) Gaertn., *Picnomon*, i restanti taxa del genere *Cirsium*, *Carduus* L. e *Tyrimnus* Cass.. Tuttavia, sebbene con ricorrenza del 50%, esiste un gruppo potenzialmente monofiletico che include tutti gli appartenenti alla sezione ad esclusione di *C. vulgare* e che include anche *Picnomon acarna* e *Notobasis syriaca* (L.) Cass.

Fig.18: Cladogramma di consenso di maggioranza ottenuto dall'analisi della matrice ITS1-2 di letteratura a cui sono state unite le sequenze ITS1-2 fuse dei campioni in analisi; i valori riportati sui rami rappresentano la percentuale di ricorrenza del clado nell'analisi.

In seguito sono state effettuate analisi cladistiche per le specie della sezione *Eriolepis*, generando cladogrammi di consenso stretto per ciascun marcatore. In tutte le analisi *C. palustre* è stato utilizzato come outgroup e *Picnomon acarua* è stato inserito, sebbene non appartenente al genere. Questa scelta è stata motivata dal risultato ottenuto nella precedente analisi cladistica secondo la quale *Picnomon acarua* è addentro al gruppo di studio. Anche campioni di *Notobasis syriaca* sono stati considerati per l'inserimento nello studio ma non è stato possibile ottenere DNA utile.

Nel cladogramma ITS1 (Fig. 19) *C. vulgare* è sister group a tutte le altre specie in studio. Nel clado più interno, basalmente, si riscontra *C. italicum* che fa da sister group al clado contenente alla base *Picnomon acarua*, a sua volta in relazione di sister group con le altre specie. Anche la sistematica di *Picnomon acarua* all'interno della sezione sembra essere ben risolta dal marcatore ITS1 con una percentuale di bootstrap a sostegno pari a 75. *Picnomon acarua* è immediatamente esterno ad un clado all'interno del quale si nota un'entità monofiletica ben definita formata da *C. ligulare* e *C. scabrum* (percentuale di bootstrap 100). Con tali specie *Picnomon acarua* condivide l'areale. Vi è, poi, un altro grande clado suddiviso a sua volta in due rami; uno è rappresentato da *C. costae*, l'altro è il grande clado contenente tutte le altre specie della sezione, dalla sistematica irrisolta. All'interno di quest'ultimo clado si riconoscono solo due gruppi ben distinguibili formati l'uno da *C. bulgaricum* e *C. hypopsilum*, l'altro da *C. ciliatum* e *C. polycephalum*, entrambi costituiti da specie a distribuzione esclusivamente balcanica.

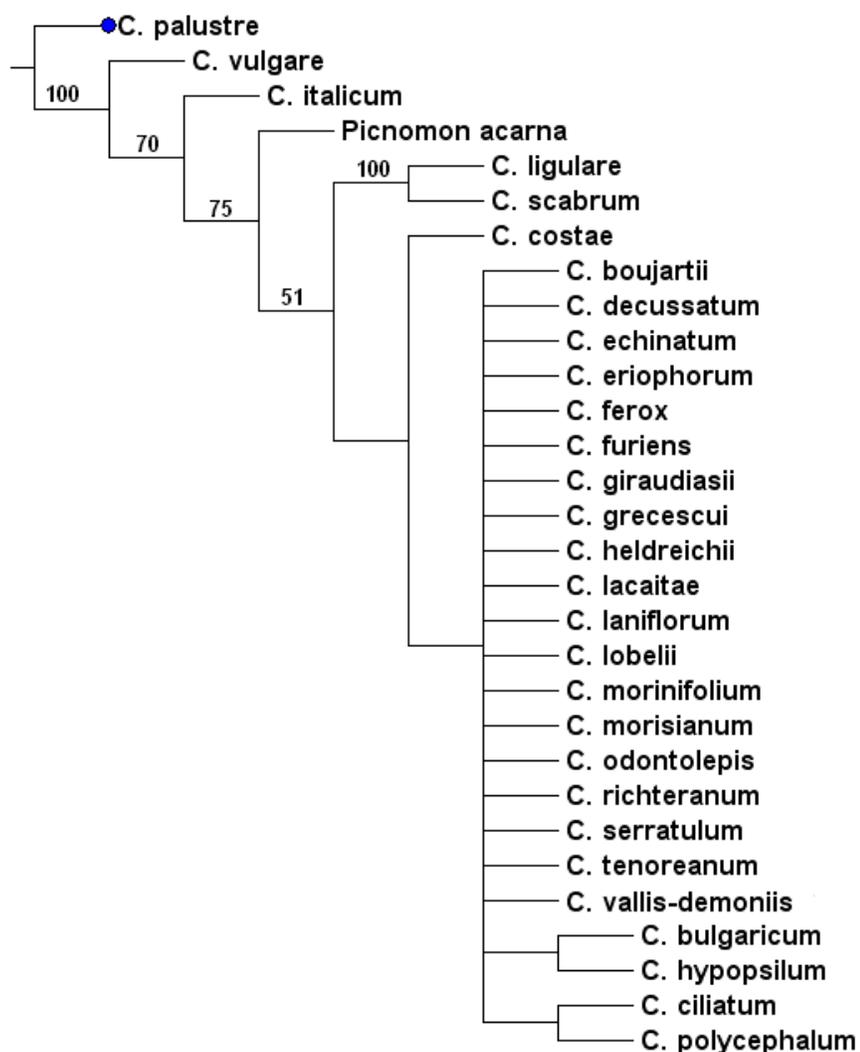


Fig.19: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice ITS1; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Il cladogramma della matrice delle sequenze ITS2 (Fig. 20), nell'ambito dei marcatori nucleari utilizzati, non sembra risolvere altrettanto bene la filogenesi del gruppo, fornendo inoltre, dati non sempre concordanti con quelli ottenuti dall'analisi del marcatore ITS1. In posizione basale rispetto alle restanti specie troviamo sempre *C. vulgare* e *C. italicum* ma qui *C. italicum* forma un clado ben risolto con un'altra specie del gruppo *C. serratulum*, il cui areale di distribuzione ricade esclusivamente nell'est della Romania ed in Russia ma con

cui talvolta condivide il carattere morfologico delle foglie decorrenti, anche se in *C. serratulum* le foglie sono decorrenti solo per pochi centimetri. Questo clado ben risolto fa da sister a due cladi dalla sistematica risolta solo parzialmente, un clado contenente *Picnomon acarna*, l'altro contenente le restanti specie della sezione. All'interno di questo grande gruppo è possibile riconoscere un clado ben definito formato da *C. costae* e *C. decussatum* nonché diversi piccoli gruppi monofiletici non supportati da elevati valori di bootstrap. *C. costae* e *C. decussatum* presentano areali di distribuzione distanti e precisamente *C. costae* è endemico della Spagna mentre *C. decussatum* è diffuso nell'Europa centro-orientale.

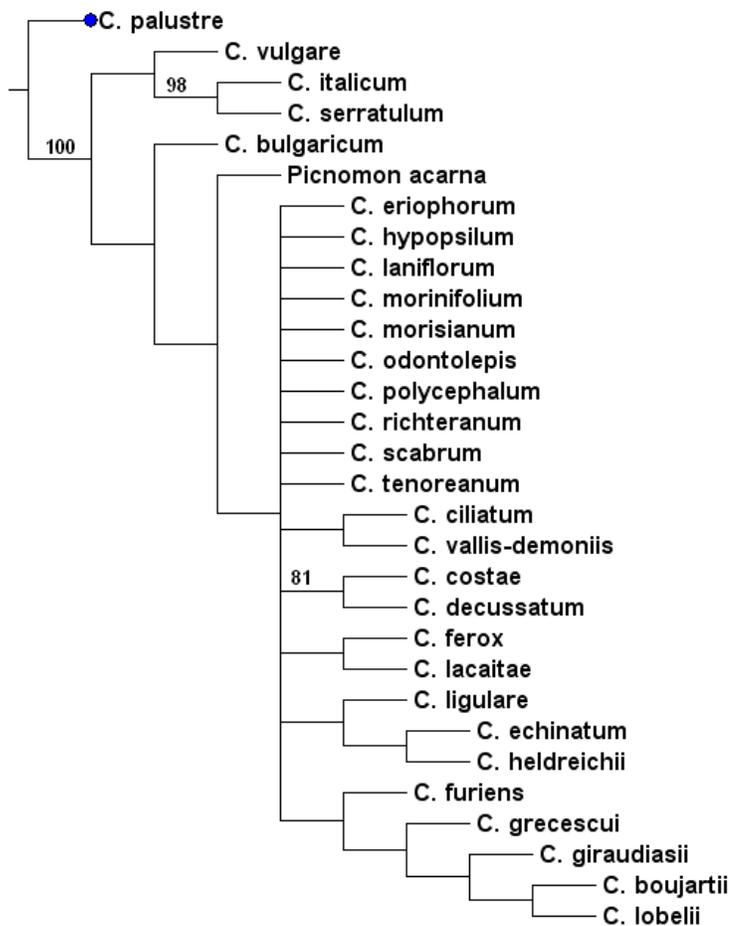


Fig.20: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice ITS2; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Il cladogramma ETS presenta quattro specie in meno rispetto agli altri (*C. costae*, *C. decussatum*, *C. hypopsilum* e *C. bulgaricum*) a causa di difficoltà di amplificazione nei suddetti campioni. Tuttavia il cladogramma di consenso stretto ottenuto (Fig. 21) ha fornito una risoluzione paragonabile a quella ottenuta mediante l'utilizzo degli altri marcatori nucleari. In posizione basale troviamo *C. vulgare* e *C. italicum* sostenute da elevate percentuali di bootstrap. *C. italicum* fa da sister group ad un clado monofiletico ben risolto in cui ritroviamo *C. odontolepis* e *C. serratum* e ad un altro clado contenete *Picnomon acarna* ed il gruppo di politomico delle restanti specie. Il clado politomico non presenta una buona risoluzione per tutte le specie in esso contenute sebbene sia possibile riconoscere tre rami distinti, uno contenente *C. scabrum*, uno formato da *C. ciliatum* e *C. polycephalum* a costituire una unità monofiletica, ed infine un gruppo quasi completamente irrisolto delle restanti specie del gruppo. All'interno di questo si evidenziano tuttavia due cladi risolti con percentuali di bootstrap superiori al 50% e precisamente un clado formato dalle specie *C. boujartii* e *C. furiens* (percentuale di bootstrap 69) presenti entrambe in Romania ed Ungheria ed un clado sostenuto da una percentuale di bootstrap pari a 58 formato dalle specie *C. morisanum* e *C. lobelii* due specie presenti in Italia e con areali parzialmente sovrapponibili.

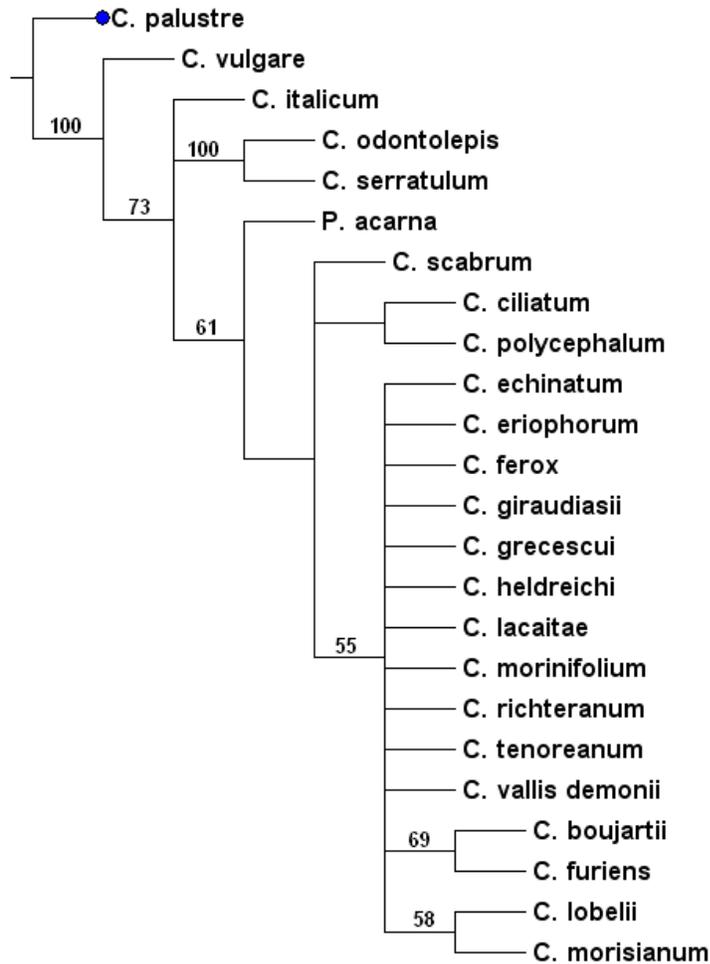


Fig. 21: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice ETS; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

L'analisi dei singoli marcatori plastidiali ha originato cladogrammi maggiormente informativi solo per quanto riguarda l'introne *rps16* e lo spaziatore *trnC-ycf6* mentre lo spaziatore *psbA-trnH* è risultato poco informativo. Il cladogramma derivante dall'analisi delle specie mediante l'utilizzo del marcatore *rps16* (Fig. 22) mostra ancora una volta le specie *C. vulgare* e *C. italicum* in posizione basale rispetto a tutte le altre specie della sezione; esse inoltre presentano una filogenesi ben risolta e quindi supportata da elevate percentuali di bootstrap. *C. italicum* fa da sister group ad un grande clado all'interno del

quale si riconoscono cinque gruppi ben definiti due dei quali sono a distribuzione esclusivamente balcanica ovvero il clado formato da *C. grecescui* e *C. polycephalum* (percentuale di bootstrap 99) e il clado formato da *C. boujartii* e *C. bulgaricum* (percentuale di bootstrap 71). Vi è poi un clado formato da *C. ciliatum* diffuso nella penisola balcanica e *C. ferox* presente esclusivamente nel nord Italia, in Francia ed in Spagna, sostenuto da un valore di bootstrap pari a 70, nonché un clado formato da *C. furiens* e *C. odontolepis* presenti nella penisola iberica ma con *C. furiens* ritrovato anche in Bulgaria e Romania. Infine vi sono due cladi non ben risolti a distribuzione mediterranea: il clado che comprende *C. echinatum*, *C. giraudiasii*, *C. morisianum*, *C. morinifolium* e *C. richterianum* distribuiti in tutta l'area mediterranea, laddove ritroviamo *C. morinifolium* che è un endemismo dell'isola di Creta; il clado formato da *C. lacaitae*, *C. tenoreanum*, *C. vallis demoniis*, *C. eriophorum* e *C. costae* comprendente tre specie a distribuzione esclusivamente italiana, *C. eriophorum* diffuso in tutta l'Europa e *C. costae* endemico spagnolo.

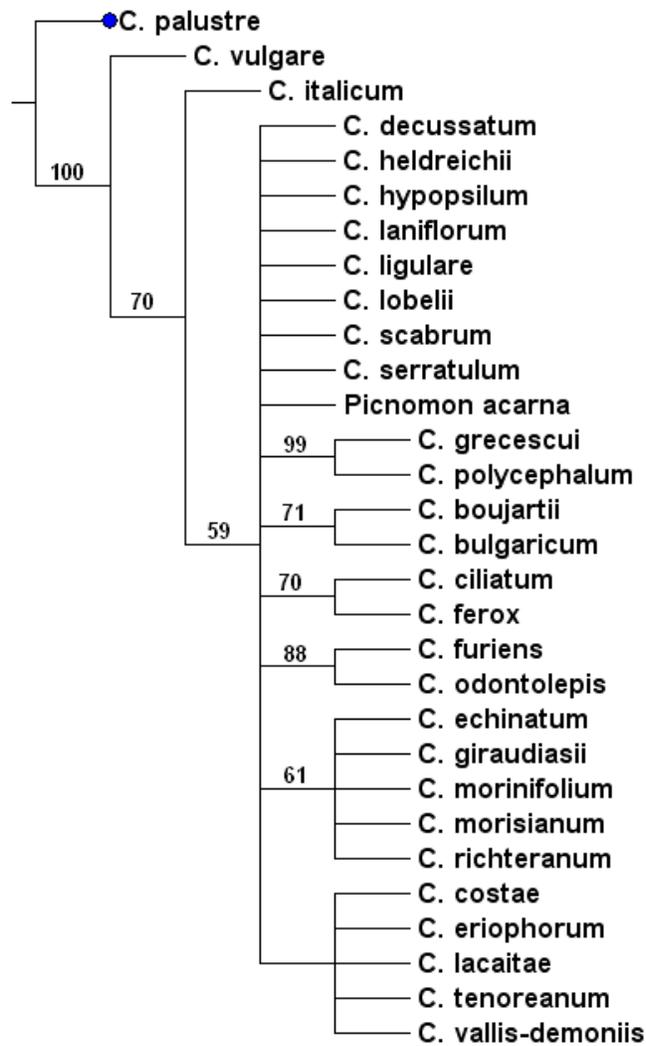


Fig. 22: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice *rps16*; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Il cladogramma dello spaziatore *trnC-ycf6* (Fig. 23), a dispetto di tutti gli altri marcatori considerati, prima pone *C. scabrum* in posizione basale rispetto alle restanti specie del gruppo. Questo fa da sister group al clado contenente tutte le altre specie. Al suo interno troviamo una serie di piccoli cladi coerenti con gli areali di distribuzione delle specie coinvolte. Tra di essi è possibile riconoscere il clado di *C. echinatum* e *C. morisianum* rispettivamente presenti in Spagna e nel nord ovest dell'Italia; il clado formato da *C. eriophorum*, *C. te-*

noreanum e *C. vallis demoniis* laddove *C. tenoreanum* e *C. vallis demoniis* sono presenti esclusivamente in Italia con areali contigui ma non sovrapposti ed inoltre laddove le tre specie coinvolte risultano molto simili anche dal punto di vista morfologico; il clado interessante formato da *C. ferox* e *C. lobelii*, anch'essi ad areale continuo ma non simpatico ed entrambi presenti esclusivamente nell'area del Mediterraneo; il clado di *C. decussatum* e *Picnomon acarna* che presentano areali di distribuzione complementari ed infine, l'unico clado ben risolto formato da *C. vulgare*, ubiquitario, *C. furiens* e *C. serratum* distribuiti nella penisola balcanica.

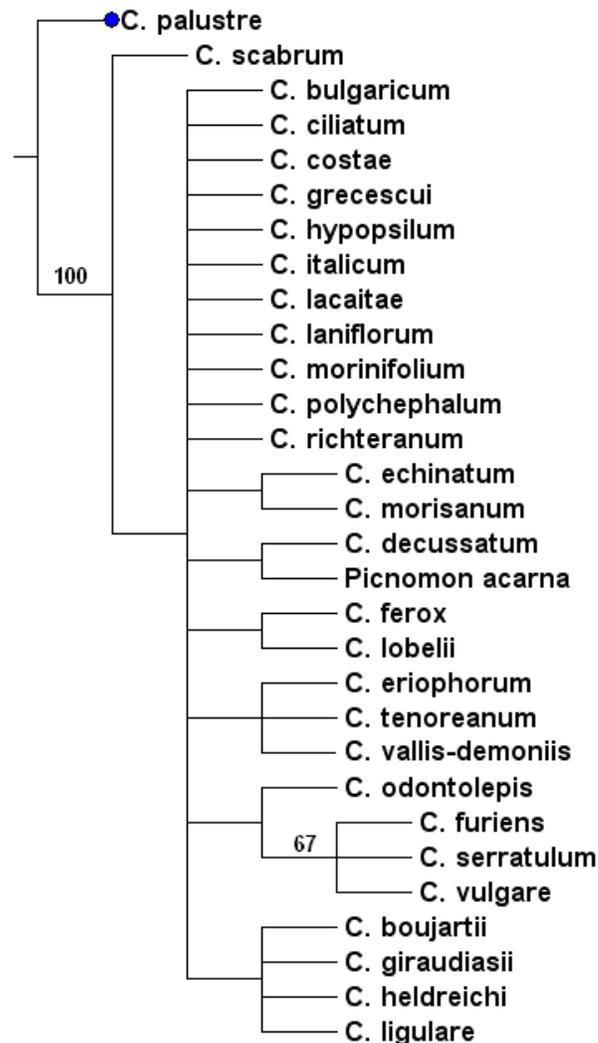


Fig. 23: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice *trnC-ycf6*; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

L'analisi del cladogramma derivante dallo spaziatore *psbA-trnH* (Fig. 24) fornisce infine un ridotto numero di informazioni utili poiché presenta un elevato livello di omoplasia. Considerazioni interessanti che derivano dalla sua analisi sono la presenza in posizione basale di entrambe le specie ritrovate negli altri cladogrammi in tale posizione ovvero *C. vulgare* e *C. scabrum*, insieme al *C. bulgaricum* nonché la presenza del clado formato da *C. boujartii* e *C. ligulare* ad areale simpatico nella penisola balcanica (percentuale di bootstrap 62) all'interno del grande clado irrisolto contenente tutte le restanti specie della sezione.

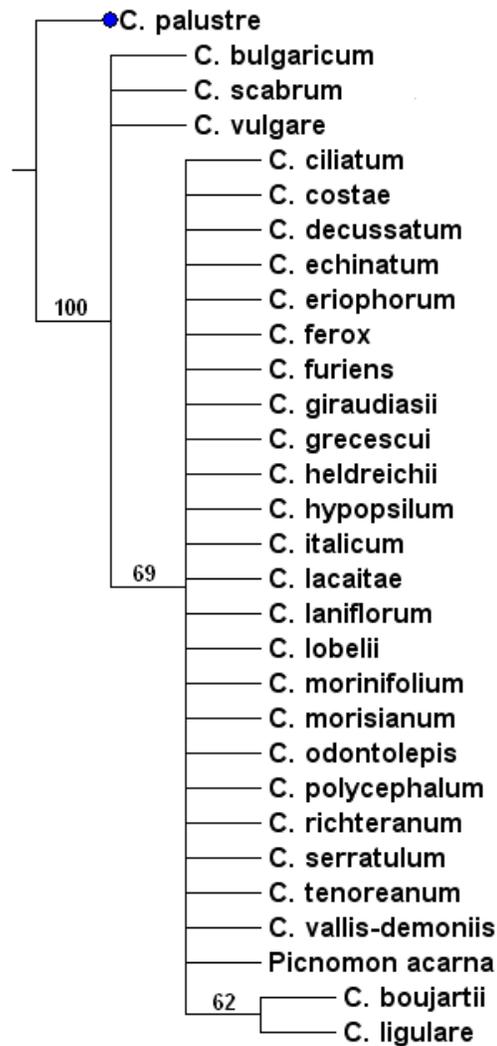


Fig. 24: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dall'analisi della matrice *psbA-trnH*; i valori riportati sui rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Al fine di generare tre matrici fuse ed effettuare tre differenti analisi di massima parsimonia: una per i marcatori nucleari ITS1-ITS2 ed ETS, una per le sequenze plastidiali *psbA-trnH*, *trnC-ycf6* ed *rps16* ed infine una terza analisi riguardante tutti i marcatori in analisi, è stata effettuata un'analisi di congruenza (ILD test, Farris *et al.*, 1995) per valutare la compatibilità tra i segnali filogenetici derivanti dai singoli marcatori. Questa analisi ha prodotto un valore di P corrispondente ad un livello di incongruenza non significativo per ogni

marcatore tranne nel caso del marcatore ETS risultato incongruente nel confronto con gli altri (l'ILD test per l'ETS è stato effettuato privando anche le altre matrici dei taxa non presenti nella matrice ETS); ciò ha consentito la fusione delle matrici escludendo, però, il suddetto marcatore (Tab. 2).

Tabella 2 - Dati relativi all'analisi cladistica

	ITS1/ITS2	<i>psbA-trnH/rps16/trnC-ycf6</i>	Matrice combinata
Lunghezza matrice allineata	615	1492	2107
Numero di caratteri informativi	67	71	138
Numero di alberi a eguale parsimonia	1186	402	99
Lunghezza degli alberi*	152 (190)	153 (212)	330 (357)
Indice di consistenza*	51 (41)	50 (36)	46 (43)
Indice di ritenzione*	57 (35)	57 (25)	50 (42)

*caratteri non informativi esclusi; tra parentesi i dati relativi all'albero di consenso stretto

Dall'analisi del cladogramma generato dalla matrice fusa ITS 1-2 (Fig. 25) non si ottiene una risoluzione soddisfacente delle relazioni filogenetiche all'interno della sezione *Eriolepis*, l'unico dato interessante è la presenza in posizione basale di *C. vulgare* e della permanenza del clado ben risolto formato da *C. scabrum* e *C. ligulare* (percentuale di bootstrap 99). Apprezzabile è anche il clado costituito da *C. italicum* e *C. serratum*, sostenuto da un valore di bootstrap superiore al 50% ed anch'esso più volte riscontrato.

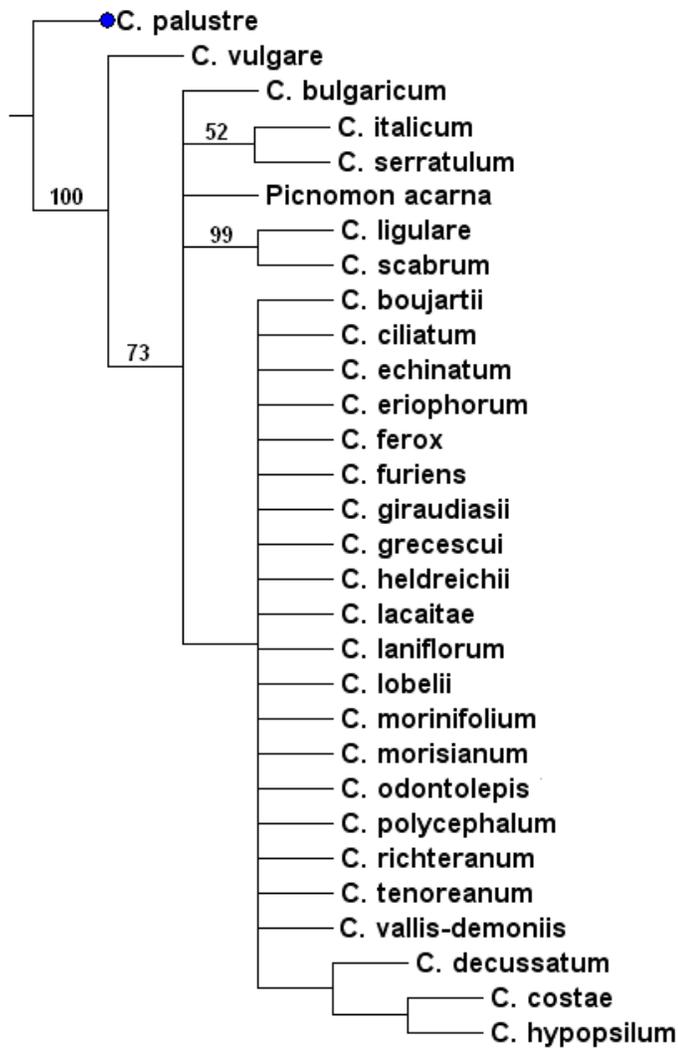


Fig. 25: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dalla matrice combinata dei marcatori ITS1 e ITS2; i valori rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Dati discordanti sono quelli ottenuti dall'analisi del cladogramma della matrice plastidiale (Fig. 26) che inserisce in posizione basale *C. scabrum* e *C. bulgaricum*. Anche in questo caso non vi è risoluzione delle relazioni filogenetiche fra le specie e l'unico clado sostenuto da una percentuale di bootstrap molto elevata è quello costituito da *C. grecescui* e *C. polycephalum*.

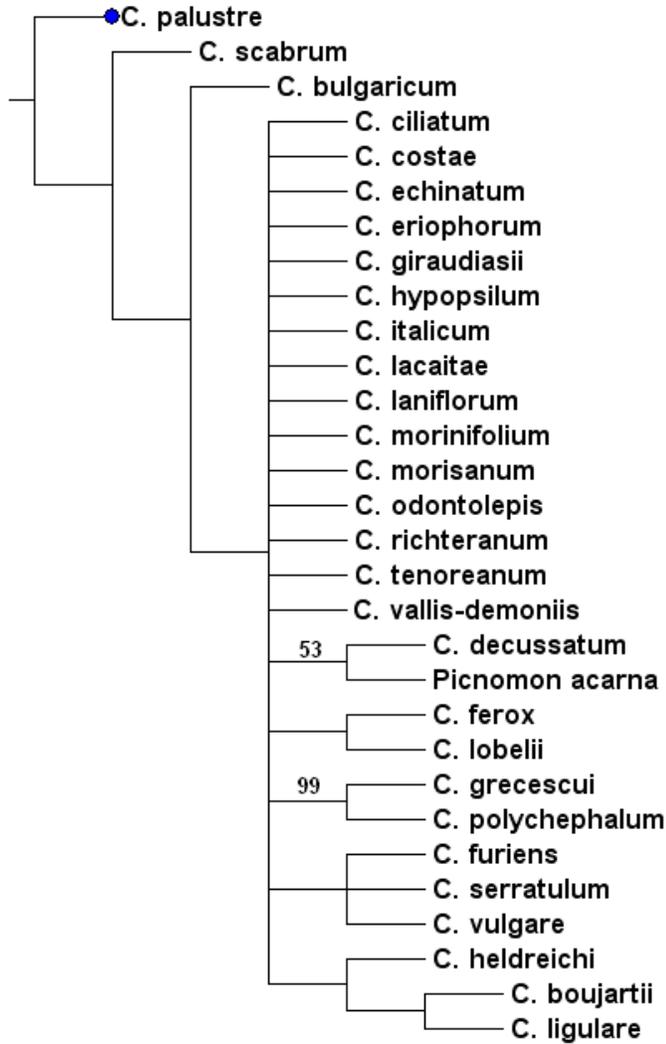


Fig. 26: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dalla matrice combinata dei marcatori plastidiali; i valori rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Una migliore risoluzione della filogenesi della sezione *Eriolepis* la si ottiene dall'analisi del cladogramma generato dalla matrice fusa dei cinque marcatori in analisi (Fig. 27). Con elevate percentuali di bootstrap a sostegno, in posizione basale troviamo *C. vulgare* e *C. italicum*, le due specie a foglie decorrenti, con *C. italicum* che fa da sister group ad un clado che si divide in due rami. Al suo interno il clado formato da *Picnomon acarna* fa da sister group al clado formato da *C. ligulare* e *C. scabrum* (percentuale di bootstrap

pari a 97). L'altro grande clado contenente tutte le restanti specie della sezione mostra al suo interno molte specie dalla sistematica non risolta, nonché cinque rami politomici filogeneticamente separati. Due cladi ben risolti sono quelli formati dalle specie balcaniche *C. polycephalum* e *C. grecescui*, *C. furiens* e *C. serratum*; un altro è dato dalle quattro specie maggiormente somiglianti dal punto di vista morfologico ed appartenenti al “gruppo di *C. eriophorum*”, ovvero *C. eriophorum*, *C. lacaitae*, *C. tenoreanum* e *C. vallis demoniis*, con le ultime due a formare un clado separato sostenuto da una percentuale di bootstrap pari a 71. Infine si distingue il clado formato dalle specie *C. giraudiasii*, *C. echinatum* e *C. morisanum* che presentano un areale di distribuzione contiguo e talvolta simpatico.

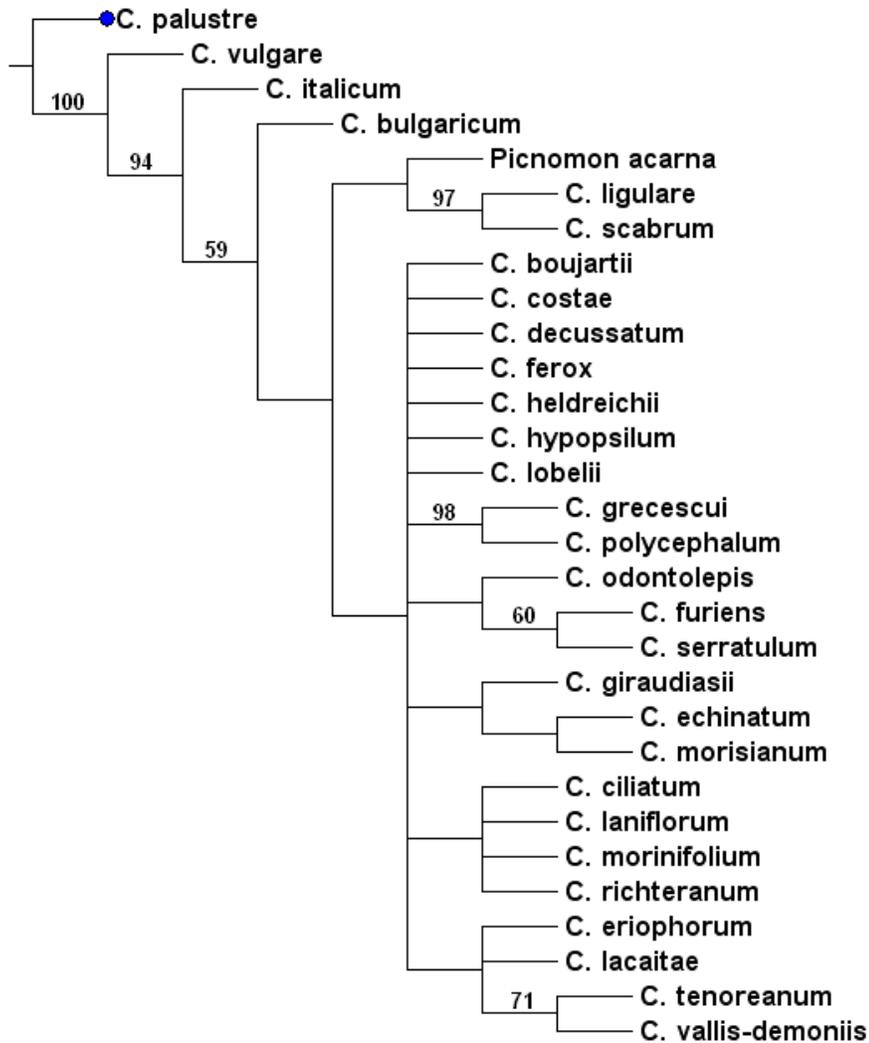


Fig. 27: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dalla matrice combinata di tutti i marcatori in analisi; i valori rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

L'analisi filogenetica della matrice ottenuta in seguito alla fusione delle matrici dei singoli marcatori non ha tuttavia condotto ad una risoluzione soddisfacente delle relazioni filogenetiche tra le specie della sezione *Eriolepis*, a causa dello scarso numero di sinapomorfie a sostegno dei cladi, nonché delle discordanze rilevabili fra i dati derivanti dai due differenti genomi, pertanto è stata effettuata una ulteriore analisi cladistica con il metodo dell'*Implied weighting* (Farris, 1969; Goloboff, 1993), che prevede l'attribuzione di un peso differen-

te ai caratteri omoplastici a seconda del numero di passi aggiuntivi che essi generano. Per effettuare tale analisi ci si è avvalsi del software TNT (Goloboff *et al.*, 2008). L'analisi ha prodotto 6 alberi egualmente parsimoniosi ed il cladogramma ottenuto è rappresentato in figura 28; sui rami sono riportate le percentuali di bootstrap.

Il cladogramma ottenuto da analisi cladistica con *implied weighting* offre una risoluzione simile delle relazioni esistenti fra le specie, riproponendo i principali arrangiamenti ottenuti mediante la prima analisi cladistica. *C. vulgare* si presenta in posizione basale quindi ritroviamo *C. bulgaricum* che fa da sister group al clado formato da *C. italicum* e *C. serratum*. *C. italicum*, *C. vulgare* e *C. serratum* condividono il carattere morfologico delle foglie decorrenti sul fusto, *C. bulgaricum* non condivide questo stesso carattere ma presenta un areale di distribuzione contiguo rispetto a *C. serratum*. *C. scabrum* e *C. ligulare*, distribuite rispettivamente nel Mediterraneo occidentale ed orientale, fanno parte di un clado ben definito, sostenuto un'elevata percentuale di bootstrap. Tale clado si trova in un gruppo che comprende anche *Picnomon acarna*. Sister group di questo clado è un altro clado che si ramifica in due gruppi, uno formato da *C. boujartii*, *C. furiens* e *C. odontolepis*, a distribuzione balcanica le prime due e presente in Francia e Spagna la terza; l'altro a sua volta suddiviso in tre politomie. Al suo interno riconosciamo il clado formato da *C. polycephalum* e *C. grecescui* a distribuzione balcanica, nonché il grande clado che comprende tutte le specie del gruppo di "*C. eriophorum*", ed altre specie distribuite lungo tutte le regioni mediterranee dalla Spagna alla penisola balcanica. Così come nel primo cladogramma di massima parsimonia (Fig. 27), anche in questa analisi *C. tenoreanum* e *C. vallis demoniis*, specie endemiche rispettivamente del centro e sud Italia, risultano sister group. Alla base di questo clado vi sono *C.*

lacaitae (Campania), e *C. eriophorum*, specie ad ampia distribuzione che dall'Italia centrale si spinge fino al nord Europa.

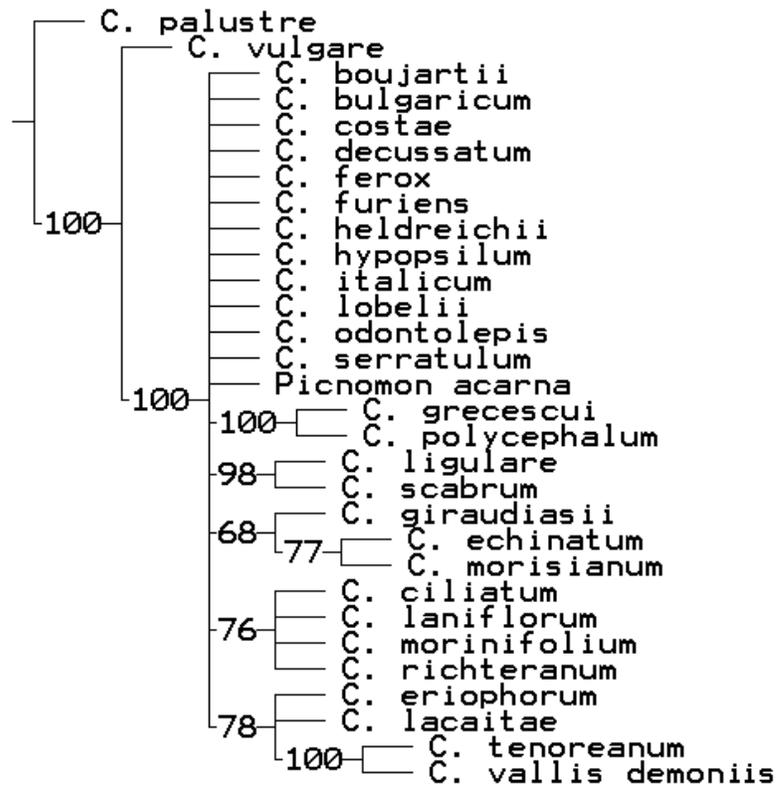


Fig. 28: Cladogramma di consenso stretto ottenuto dalla combinazione di tutti i marcatori in analisi mediante la metodica dell'*implied weighting*; i valori riportati al di sopra dei rami rappresentano le percentuali di *bootstrap* superiori al 50%.

Al fine di studiare l'influenza della composizione in basi sulla nostra ricostruzione filogenetica, è stata eseguita anche un'analisi statistica bayesiana mediante l'utilizzo del programma Mr Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Il cladogramma generato (Fig. 29) mostra risultati che sono del tutto congruenti con quelli ottenuti dalle analisi cladistiche (la topologia dell'albero

BA è una delle topologie MP), con probabilità posteriori spesso elevate di risoluzione dei rapporti filogenetici fra le specie in analisi.

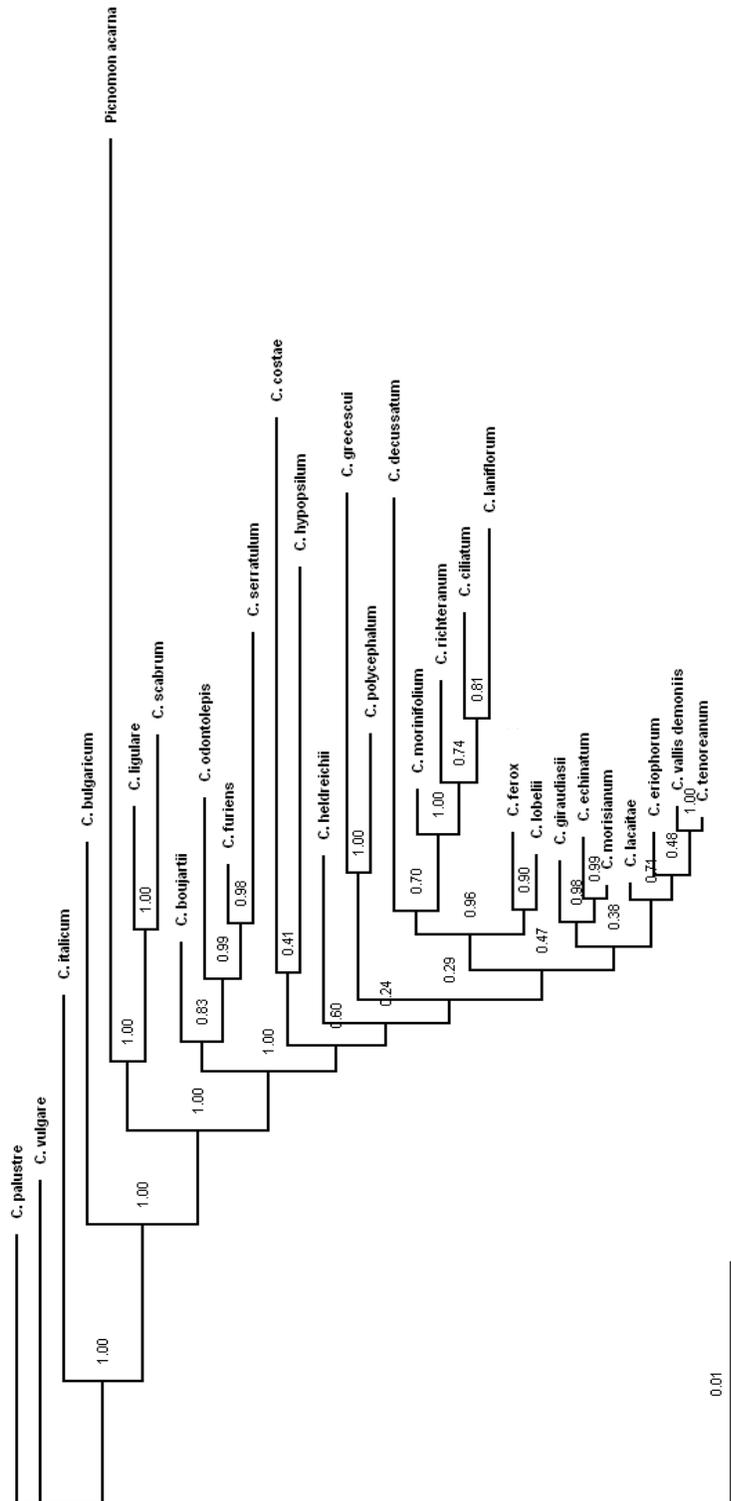


Fig. 29: Filogenesi della sezione *Eriolepis* ottenuta mediante analisi bayesiana. I valori riportati sui rami rappresentano le probabilità di verifica delle ipotesi fatte per la costruzione di suddetta filogenesi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dal confronto dei dati riguardanti le matrici ottenute dai singoli marcatori riportati in tabella 2, si evince che il numero complessivo dei caratteri informativi derivanti da genoma nucleare è 131 mentre quello derivante da genoma plastidiale è 71. Il genoma nucleare fornisce, quindi, un più elevato numero di caratteri informativi. Tuttavia, osservando i singoli cladogrammi è possibile notare che le due tipologie di marcatore incidono allo stesso modo sulla risoluzione ma a differenti livelli della filogenesi. I marcatori nucleari risolvono meglio le relazioni esistenti fra le specie in posizione basale mentre i marcatori plastidiali risolvono maggiormente le relazioni filogenetiche esistenti fra i cladi derivati. Ciononostante, dall'analisi dei cladogrammi generati dalle matrici fuse, per le due tipologie di genoma, nonché dal loro livello di risoluzione, si osserva che nessuna delle due tipologie di marcatore, da sola, è sufficiente a delineare la filogenesi completa del gruppo. Dall'analisi dei singoli marcatori utilizzati nello studio si evince che, sebbene siano tutti considerati potenzialmente adatti per la risoluzione filogenetica a bassi livelli tassonomici e sebbene lo spaziatore intergenico *psbA-trnH* sia addirittura considerato un potenziale marcatore *barcoding* (Kress et al., 2005; Shneyer, 2009), nessuno di essi è risultato sufficiente nella risoluzione filogenetica del gruppo. Infine, la discordanza dei risultati ottenuti dall'analisi delle matrici nucleare e plastidiale, sebbene l'ILD test di verifica della congruenza non abbia dato valori elevati in tal senso, può essere spiegata supponendo differenti modelli evolutivi per i due diversi genomi nonché

considerando l'influenza delle due vie di ereditarietà coinvolte per questi marcatori.

Dal cladogramma ottenuto dall'analisi della sottofamiglia delle *Carduinae* mediante l'utilizzo dei marcatori ITS1 e ITS2 uniti, è possibile dedurre che la sezione *Eriolepis* non è monofiletica. Tuttavia, se si esclude da essa *C. vulgare*, tutte le altre specie della sezione appartengono a un gruppo monofiletico che include anche probabilmente *Notobasis syriaca*, unico membro del genere *Notobasis*, e *Picnomon acarna*, unico rappresentante del genere *Picnomon*.

Dalle analisi condotte sulla matrice ottenuta unendo le sequenze dei cinque marcatori in analisi con le metodiche della massima parsimonia, anche applicando l'*implied weighting*, non si è giunti ad una filogenesi soddisfacente all'interno della sezione, concordemente con la difficile sistematica del gruppo dal punto di vista morfologico.

L'analisi bayesiana ha prodotto un albero la cui topologia, ovviamente del tutto risolta, è inclusa nell'insieme degli alberi ad eguale parsimonia ottenuti dalle indagini MP. Detto albero, cioè, oltre ad essere la soluzione preferenziale nella BA, è *una* delle soluzioni preferenziali anche nelle altre indagini. Pertanto, esso viene assunto come ipotesi filogenetica per la sezione *Eriolepis*.

L'albero in questione (Fig. 29) mostra raggruppamenti monofiletici che spesso trovano forti correlazioni con la biogeografia delle specie. Dall'analisi dell'albero è possibile affermare ancora una volta che *C. italicum* e *C. vulgare* si trovano in posizione basale rispetto alle altre specie della sezione ponendosi come sister group di queste. *C. vulgare* e *C. italicum* condividono anche un carattere morfologico assente nelle restanti specie della sezione, ovvero le

foglie decorrenti sul fusto. Anche dall'analisi bayesiana risulta confermata la posizione di *Picnomon acarna* all'interno del gruppo con una probabilità posteriore pari a 1. *Picnomon acarna* presenta un areale di distribuzione che si estende lungo tutta l'Europa meridionale e questa distribuzione potrebbe essere di aiuto per spiegare l'origine di *C. scabrum* e *C. ligulare* (la cui relazione di sister group è fortemente sostenuta in tutte le indagini). *C. scabrum* e *C. ligulare*, infatti, presentano areali di distribuzione contigui ma non sovrappoventisi, con *C. scabrum* presente in sud Italia, Sardegna, Francia e Spagna e *C. ligulare* presente in gran parte della penisola balcanica. Una tale distribuzione potrebbe derivare da un unico evento di speciazione per vicarianza a partire da una specie ad ampio areale.

Difficilmente definibile è il clado che presenta *Cirsium boujartii* in posizione basale, sister group al clado contenente *C. odontolepis*, *C. furiens* e *C. serratum*. Tali specie presentano areali di distribuzione non sovrappoventibili né contigui, con *C. odontolepis* presente nella maggior parte della Spagna e *C. furiens*, *C. serratum* e *C. boujartii* distribuiti nella Penisola Balcanica.

Un altro clado dalla difficile comprensione sotto il profilo distributivo è quello formato da *C. costae* e *C. hypopsilum*; anche in questo caso abbiamo una specie endemica presente in Catalogna e nella contigua regione francese della Linguadoca-Rossiglione ed una specie presente esclusivamente in Grecia.

Si riconosce poi un clado monofiletico che fa da sister group ad un grande clado a probabilità posteriore non elevata. Ne fanno parte *C. grecescui* presente in Serbia e in Romania e *C. polycephalum* esclusivamente turco. La loro origine potrebbe ricondursi ad un evento di vicarianza avutosi lungo il Bosforo.

Il clado formato da *C. morinifolium*, *C. rictheranum*, *C. ciliatum* e *C. laniflorum*, anch'esso sostenuto da un valore di probabilità a posteriore pari a 1, mostra suggestive correlazioni biogeografiche. Anche in questo clado infatti la distribuzione delle specie rispecchia una tipologia di diffusione a partire dal sud del Mediterraneo: *C. morinifolium*, infatti, è endemico dell'isola di Creta ma è sister group alle altre tre specie del clado, *C. rictheranum*, *C. ciliatum* e *C. laniflorum*, rispettivamente presenti sui Pirenei, e, i secondi due, complessivamente in Slovenia, Turchia e Crimea. Areali disgiunti Est/Ovest nella regione mediterranea sono piuttosto comuni in vari gruppi tassonomici. Questo tipo di distribuzione, unito al fatto che il sister group (*C. morinifolium*) è strettamente endemico di un'antica isola di origine tettonica (e non vulcanica) permette di ipotizzare che il clado abbia avuto origine durante il Messiniano, nel tardo Miocene, circa 5 mya. A quel tempo il Mediterraneo, a causa della chiusura degli stretti betico-rifani (Hsu *et al.*, 1973; Cita and Ryan, 1978; Cita and Wright, 1979; Cita, 1982; Duggen *et al.*, 2003; Agusti *et al.*, 2006), era molto ridotto rispetto ad oggi, in quanto la portata dei maggiori fiumi (Danubio e Nilo) non era sufficiente, in assenza di apporto di acqua oceanica, a compensare l'evaporazione. Esso era suddiviso in due bacini, uno grossolanamente corrispondente al Mediterraneo occidentale e l'altro (il "lago-mare") al Mediterraneo orientale. Questa separazione ha determinato la vicarianza di molti taxa, isolati sulle rive dei due specchi d'acqua e separati da aree di terraferma salinizzate e desertiche.

Nel clado di *Cirsium ferox* e *C. lobelii* si osserva invece, dal punto di vista biogeografico, che la seconda specie (Appennini centro-meridionali) è un segregato meridionale di una specie a più ampio areale (*C. ferox* è infatti distribuito dalla Spagna alla Liguria, ed è quindi contiguo all'areale del secondo).

Gli ultimi due cladi di rilievo evidenziati dall'analisi bayesiana riguardano specie tutte strettamente mediterranee. Il primo clado individuabile, sostenuto da un valore di probabilità posteriore molto elevato (0.98), è quello che mostra *C. giraudiasii* quale sister group dell'unità monofiletica formata da *C. echinatum* e *C. morisianum*. *Cirsium giraudiasii* è una specie presente solo in Spagna mentre *C. echinatum* e *C. morisianum* presentano areali contigui ma non simpatrici con *C. morisianum* distribuito nelle Alpi occidentali e sud-occidentali, dalla Francia al Piemonte e alla Liguria, fino ad Abruzzo e Lazio e *C. echinatum* presente in Francia e Spagna; anche nel caso delle ultime due specie, è ipotizzabile un evento di vicarianza a cavallo delle Alpi..

L'ultimo clado che viene menzionato è quello formato da *C. tenoreanum* e *C. vallis demoniis* (presenti, come sister group, in un clado con *C. eriophorum* e *C. lacaitae*). L'areale di distribuzione di tali specie è contiguo e separato a livello del Massiccio del Pollino su cui sono segnalate su versanti differenti; pertanto per *C. tenoreanum* e *C. vallis demoniis* sarebbe ipotizzabile un evento di vicarianza come causa della speciazione, a partire da un ancestore comune. Alla base del clado, come appena detto, vi è *C. lacaitae*, endemica campana, seguita da *C. eriophorum*, specie ad ampia distribuzione che dal Lazio si spinge fino al nord dell'Europa. *C. lacaitae*, si ricorda, era stato interpretato in letteratura (Pignatti, 1982), come presunto ibrido tra *C. lobelii* e *C. vulgare*. La sua posizione nell'albero di Fig. 29 sembra escludere quest'ipotesi. *C. lacaitae*, invece, è prossimo a *C. eriophorum*, cui somiglia molto anche dal punto di vista morfologico.

L'analisi filogenetica qui presentata è la prima compiuta per le specie del genere *Cirsium*, appartenenti alla sezione *Eriolepis*. Nonostante il numero di marcatori sia assolutamente congruo rispetto a studi simili (per esempio, Tosh

et al., 2009-4 marcatori; Ren *et al.*, 2011-3 marcatori; Zacharias & Baldwin, 2010-3 marcatori; Baird *et al.*, 2010-3 marcatori), la risoluzione nelle analisi di massima parsimonia e i valori delle probabilità posteriori nell'analisi bayesiana sono non sempre elevati. In particolare, la ridotta risoluzione/probabilità posteriore è associata ai cladi di dimensione intermedia, piuttosto che ai piccoli gruppi di specie o alle grandi suddivisioni della sezione, quasi sempre ben risolti. Una possibile ragione di ciò potrebbe essere correlata a forti pressioni selettive in qualche fase dell'evoluzione della sezione che abbiano determinato un'estrema rapidità di evoluzione, non permettendo così l'accumularsi di molti caratteri discriminanti. Infatti, la carente risoluzione non è dovuta, per i cladi intermedi dell'albero di Fig. 28, ad omoplasia molto elevata, quanto a un numero di mutazioni ridotto. Un'ipotesi a latere potrebbe essere che l'evoluzione dei cladi all'interno della sezione derivi da antiche ibridazioni tra specie molto diffuse. Ciò di norma determina, in modo quasi istantaneo, la formazione di nuovi tipi morfologici che poi possono essere soggetti a evoluzione separata successiva. Nonostante le difficoltà di risoluzione sistematica, è stato tuttavia possibile dare indicazioni sulla relazione tra relazioni filogenetiche e distribuzione geografica delle specie del gruppo. La distribuzione nell'area del Mediterraneo, ed in particolare l'ampia diffusione nelle tre penisole del Mediterraneo (italiana, iberica e balcanica), permette di ipotizzare che vi siano state una o più radiazioni adattative originantisi dal Mediterraneo, a partire da tempi immediatamente post-Miocenici e, successivamente, dopo l'ultima glaciazione; infatti, escludendo *C. eriophorum* il cui areale ha come limite nord la Gran Bretagna, *C. ciliatum*, il cui limite nord dell'areale è in Ucraina, *C. decussatum* ritrovato anche in Polonia e *C. vulgare* che è ubiquitaria in tutta l'Europa, la sezione *Eriolepis* è attualmente presente nelle regioni più a

sud dell'Europa. Inoltre, la sezione *Eriolepis* non solo è caratterizzata da un'estrema omogeneità fenotipica, ma anche ecologica: quasi sempre le specie abitano luoghi degradati, aperti, zone di pascolo o radure boschive, arrivando fino a 2000m di altitudine, tanto da non rendere possibile la suddivisione della sezione in gruppi di specie sulla base dell'ecologia. Verosimilmente, la difficoltà nel risolvere le relazioni all'interno della sezione si debbono all'estrema affinità delle specie in studio. La sezione *Eriolepis* sembra un caso esemplare di inflazione tassonomica, come molti altri taxa appartenenti alle *Asteraceae*, con molte delle specie, fondate su caratteri oscuri e incerti, che probabilmente meriterebbero il rango di sottospecie o di varietà locali.

BIBLIOGRAFIA

- Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L. and Moretti A. (1999).** Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. **Mol. Phyl. Evol.**, 13: 67-76.
- Adanson M. (1763) [1764].** Familles des plantes. 2 vols. Paris. [Vol. 1, 1764; vol. 2, 1763.]
- Agustí J., Oms O., Furió M., Pérez-Vila M.J. and Roca E. (2006).** The Messinian terrestrial record in the Pyrenees: The case of Can Vilella (Cerdanya Basin). **Palaeogeogr., Palaeoclimatol., 1-4:** 179-189.
- Alvarez I. and Wendel J.F. (2003).** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Mol. Phyl. Evol.**, 29: 417-434.
- Anderson E. (1948).** Hybridization of the habitat. **Evolution**, 2:1-9.
- Anderson E. (1949).** Introgressive Hybridization. (New York: John Wiley and Sons).
- Anderson E. and Hubricht L. (1938).** Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. **Amer. J. Bot.**, 25: 396-402.
- Appels R. and Dvorak J. (1982).** The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species. **Theor. Appl. Genet.**, 63: 337-348.
- Arnheim N., Krystal M., Schmickel R., Wilson G., Ryder O. and Zimmer E. (1980).** Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, 77: 7323-7327.

- Arnheim N., Krystal M., Schmickel R., Wilson G., Ryder O. and Zimmer E. (1980).** Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non homologous chromosomes in man and apes. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, 77: 7323-7327.
- Arnold M.L. (1997).** Natural hybridization and evolution. (Oxford University Press, Oxford, UK).
- Arnold M.L. and Hodges S.A. (1995).** Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? **Trend. Ecol. Evol.**, 10: 67-71. University Press, Inc., New York. University Press, Ithaca, NY.
- Avise J.C. (1994).** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Pp 511. Chapman and Hal, New York.
- Azuma H., Garcia-Franco J.G., Rico-Gray V. and Thien L.B. (2001).** Molecular phylogeny of the *Magnoliaceae*: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. **Amer. J. Bot.**, 88: 2275-2285.
- Azuma H., Thien L.B. and Kawano S. (2000).** Molecular phylogeny of *Magnolia* based on chloroplast DNA sequence data (*trnK* intron, *psbA-trnH* and *arpB-rbcL* intergenic spacer regions) and floral scent chemistry. (In: Liu Y.H., Fan H.M., Chen Z.Y., Wy Q.G., Zeng Q.W. (ed.), Proceedings of the International Symposium on the family *Magnoliaceae*.) Scientific Press, 219-227. Guangzhou China, Beijing.
- Baird K.E., Funk V.A., Wen J. and Weeks A. (2010).** Molecular phylogenetic analysis of *Leibnitzia* Cass. (*Asteraceae*: *Mutisieae*: *Gerbera*-complex), an Asian-North American disjunct genus. **J. Syst. Evol.**, 48 (3): 161-174.
- Baldwin B. and Markos S. (1998).** Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (*Compositae*). **Mol. Phyl. Evol.**, 10:449-463.

Baldwin B. G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the *Compositae*. **Mol. Phyl. Evol.**,1: 3-16.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S. and Donoghue M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 82: 247-277.

Barton N.H. (2001). The role of hybridization in evolution. **Mol. Ecol.**, 10: 551-568.

Barton N.H. and Hewitt. G.M. (1985). Analysis of hybrid zones. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 16: 113-148.

Bena G., Jubier M.F., Olivieri I., and Lejeune B. (1998). Ribosomal external and internal transcribed spacers: Combined use in phylogenetic analysis of *Medicago* (*Leguminosae*). **J. Mol. Evol.**, 46: 299-306.

Bentham G. (1873). *Compositae*. In “Genera Plantarum” (G. Bentham and J. D. Hooker, Eds.), pp. 162–533. Lovell Reeve & Co., London.

Blackmore S., Van Helvoort H.A.M. and Punt W. (1984). On the terminology, origins and functions of caveate pollen in the *Compositae*. **Rev. Palaeobot. Palynol.**, 43: 293-301.

Bonifacino J.M., Robinson H.E., Funk V.A., Lack H.W., Wagenitz G., Feuillet C. and Hind D.J.N. (2009). A History of Research in *Compositae*: Early Beginnings to the Reading Meeting (1975). (In: Funk, V. A., Susana, A., Stuessy, T. F. and Bayer, R. J., Systematics, Evolution, and Biogeography of *Compositae*. pp.3-38. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy. IAPT).

Bortiri E., Oh S.H., Jiang J.G., Baggett S., Granger A., Weeks C., Buckingham M., Potter D. and Parfitt D.E. (2001). Phylogeny and systematics of

Prunus (*Rosaceae*) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA. **Syst. Bot.**, 26: 797-807.

Bremer B. and Jansen R.K. (1991). Comparative site restriction mapping of chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within *Rubiaceae*. **Amer. J. Bot.**, 78: 198-213.

Bremer K. (1987). Tribal interrelationships of the *Asteraceae*. **Cladistics**, 3: 210–253.

Bremer K. (1994). “*Asteraceae*: Cladistics and Classification,” Timber Press, Portland.

Bremer K. and Jansen R.K. (1992). A new subfamily of the *Asteraceae*. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 79: 414-415.

Bult C.J., Sweere J.A. and Zimmer E.A. (1995). Cryptic sequence simplicity, nucleotide composition bias, and molecular coevolution in the large subunit of ribosomal DNA in plants: implications for phylogenetic analyses. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 82: 235-246.

Bureš P., Wang Y., Horová L. and Suda J. (2004). Genome size variation in central European species of *Cirsium* (*Compositae*) and their natural hybrids. **Ann. Bot.**, 94: 353-363.

Carlquist S. (1976). Tribal interrelationships and phylogeny of the *Asteraceae*. **Aliso.**, 8:465-492.

Cassini H. (1819). [Diversi articoli]. Dictionnaire de Sciences Naturelles, Paris. (In King R. and Dawson H. W. “Cassini on *Compositae*”, Eds., 1975. Oriole, New York).

Cassini M.H. (1826). Dictionnaire des Sciences Naturelles, 26: 38 -46. Paris.

Chan R., Baldwin B.G. and Ornduff R. (2001). Goldfields revisited: a molecular phylogenetic perspective on the evolution of *Lasthenia* (*Compositae*, *Heliantheae* sensu lato). **Int. J. Plant Sci.**, 162: 1347-1360.

- Cita M.B. (1982).** The Messinian salinity in the Mediterranean: a Review.(In Berkhemer E. and Hsu K. J."Alpine-Mediterranean Geodynamics" Eds., Geodynamics Series, v. 7).
- Cita M.B. and Ryan W.B.F. (1978).** Messinian erosional surfaces in the Mediterranean. **Mar. Geol.**, 27: 193-363.
- Cita M.B. and Wright R.C. (1979).** Geodinamic and Byodinamic effects of the Messinian Crisis of salinity. **Paleogeogr., Paleoclimat., Paleoecol.**, 29.
- Clausen J. (1951).** Stages in the Evolution of Plant Species. Cornell
- Clegg J.S., Jackson S.A. and Warner A.H. (1994).** Extensive intracellular translocations of a major protein accompany anoxia in embryos of *Artemia franciscana*. **Exp. Cell. Res.**, 212: 77-83.
- Clevinger J. A. and Panero J. L. (2000).** Phylogenetic relationships in *Engelmanniinae* and the genus *Silphium* (*Asteraceae: Heliantheae*) based on ITS and ETS sequence data. **Amer. J. Bot.**, 87: 565-572.
- Cronn R.C., Small R.L., Haselkorn T. and Wendel J.F. (2002).** Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium: Malvaceae*) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. **Amer. J. Bot.**, 89: 707-725.
- Cruzan M.B. and Arnold M.L. (1993).** Ecological and genetic associations in an *Iris* hybrid zone. **Evolution**, 47: 1432-1445.
- Cruzan M.B. and Arnold M.L. (1994).** Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone. **Evolution**, 48: 1946-1958.
- Culley T.M. and Wolfe A.D. (2001).** Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (*Violaceae*), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, 86: 419-517.
- Demesure B., Sodzi N. and Petit R.J. (1995).** A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Mol. Ecol.** 4: 129-131.

- Dobzhansky T.H. (1937).** The Y chromosome of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, 20: 366-376. (Further data on the variation of the Y chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. **Genet.**, 22: 340-346).
- Douglas E. (1994).** Chloroplast origins and evolution. In: Bryant D.A. (ed.), *The Molecular biology of Cyanobacteria*. Pp.: 91-118. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.
- Downie S.R. and Palmer J.D. (1992).** Restriction site mapping of the chloroplast DNA inverted repeat: a molecular phylogeny of the *Asteridae*. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 79: 266-283.
- Doyle J.J. and Beachy R.N. (1985).** Ribosomal gene variation in the soybean (*Glycine*) and its relatives. **Theor. Appl. Genet.**, 70: 369-376.
- Doyle J.J. and Doyle J.L. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, 19: 11-15.
- Doyle J.J., Doyle J.L. and Palmer J.D. (1995).** Multiple independent losses of two genes and one intron from legume chloroplast genome. **Syst. Bot.**, 20: 272-294.
- Duggen S., Hoernle K., Van den Bogaard P., Rüpke L. and Morgan J.P. (2003).** "Deep roots of the Messinian salinity crisis". **Nature**, 422: 602- 606.
- Ellstrand N.C., Whitkus R. and Rieseberg L.H. (1996).** Distribution of spontaneous plant hybrids. **P. Natl. Acad. Scien. USA**, 93:5090-5093. USA.
- Elsik W.C. and Yancey T.E. (2000).** Palynomorph biozones in context of changing paleoclimate, middle Eocene to lower Oligocene of the northwest Gulf of Mexico. **Palyn.**, 24: 177-186.
- Fang D.Q., Krueger R.R. and Roose M.L. (1998).** Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **J. Amer. Soc. Hort.**, 123, 612-617.

- Farris J.S. (1969).** A Successive approximations approach to character weighting. **Syst. Biol.**, 18: 374-385.
- Farris J.S., Kallersjo M., Kluge A.G. and Bult C. (1995).** Costructing a significance test for incongruence. **Syst. Biol.**, 44: 570-572.
- Felsenstein J., (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791.
- Ford K.A., Ward J.M., Smissen R.D., Wagstaff S.J. and Breitwieser I. (2007).** Phylogeny and biogeography of *Craspedia* (*Asteraceae: Gnaphalieae*) based on ITS, ETS and *psbA-trnH* sequence data. **Taxon**, 56: 783-794.
- Frankham R. and Ballou J.D. (2002).** Conservation genetics, 618 pp
- Funk V.A., Susanna A., Stuessy T.F., and Robinson H. (2009).** Classification of *Compositae*. Chapter 11 in Systematics, Evolution, and Biogeography of *Compositae*, Vienna, International Association for Plant Taxonomy (IAPT).
- Garcia-Jacas N., Garnatje T., Susanna A. and Vilatersama R. (2002).** Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the *Cardueae* (*Asteraceae*): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. **Mol. Phyl. Evol.**, 22: 51-64.
- Gerbi S.A. (1985).** Evolution of ribosomal DNA. Mol. Evol. Gen. (MacIntyre, R.J., ed.), pp. 419-517. Plenum Press, New York.
- Gielly L. and Taberlet P. (1994).** The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, 11: 769-777.
- Giseke P.D. (1792).** Praelectiones in Ordines Naturales Plantarum, *Compositae*. Pp 538.
- Goloboff P.A. (1993).** Estimating character weights during tree search. **Cladistics**, 9: 83-91.

- Goloboff P.A. (1998).** NONA, ver. 2.0. www.cladistics.com
- Goloboff P.A., Farris J.S. and Nixon K.C. (2008).** TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774-786.
- Good L., Intine R.V.A. and Nazar R.N. (1997).** The ribosomal-RNA processing pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.*, 247, 314-32.
- Grant J., (1966).** The Barred Owl in British Columbia. *Murrelet* 47: 39-45.
- Gray M.W. (1992).** The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 233-357.
- Greene E.L. (1983).** Landmarks of Botanical History. Stanford University Press, Stanford.
- Groves R.H. and Kaye P.E. (1989).** Germination and phenology of seven introduced thistle species in Southern Australia. *Austral. J. Bot.*, 37: 351-359.
- Gruenstaeudl M., Urtubey E., Jansen R.K., Samuel R., Barfuss M.H.J. and Stuessy T.F. (2009).** Phylogeny of *Barnadesioideae* (*Asteraceae*) inferred from DNA sequence data and morphology. *Mol. Phyl. Evol.*, 51: 572-587.
- Häffner E. and Hellwig F.H. (1999).** Phylogeny of the *Cardueae* (*Compositae*) with emphasis on the subtribe *Carduinae*: an analysis based on ITS sequence data. *Willdenowia*, 29: 27-39.
- Hall T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41:95-98.
- Hamilton M.B. (1999).** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.*, 8: 521-523
- Hamrick J.L. and Godt M.J. (1990).** Allozyme diversity in plant species. (In: Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. and Weir, B. S. (eds) Plant

Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources, pp. 43–63. Sinauer, Sunderland, MA).

Harris E.M. (1995). Inflorescence and floral ontogeny in *Asteraceae*: a synthesis of historical and current concepts. **Bot. Rev.**, 61: 93-278.

Hartmann S., Nason J. D. and Bhattacharya D. (2002). Phylogenetic origins of *Lophocereus* (*Cactaceae*) and the senita cactus-senita moth pollination mutualism. **Amer. J. Bot.**, 89: 1085-1092.

Heiser C.B. (1947). Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. **Evolution**, 1: 249-262.

Hellwig F.H. (1996). Untersuchungen zur phylogenie der *Cardueae-Centaureinae* (*Compositae*) unter verwendung molekularer und morphologisch-anatomischer merkmale. Habilitationsschrift Univ. Goöttingen. Göttingen.

Hemleben V., Ganal M., Gerstner J., Schiebel K. and Torres R.A. (1988). Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes. (In: Kahl G. (ed.), Architecture of eukaryotic genes. VCH Weinher Germany, pp. 371-383).

Hennig W. (1966). Phylogenetic Systematics, University of Illinois Press, Urbana.

Hershkovitz M.A. and Zimmer E.A. (1996). Conservation patterns in angiosperm rDNA-ITS2 sequences, **Nucleic Acids Res.**, 24: 2857-2867.

Hillis D.M. and Dixon M.T. (1991). Ribosomal DNA: molecular and phylogenetic inference. **Quart. Rev. Biol.**, 66: 411- 453.

Hitchen J., Ivakine E., Melekhovets Y.F., Lalev A. and Nazar R.N. (1997). Structural features in the 38 external transcribed spacer 302 affecting intragenic processing of yeast rRNA. **J. Mol. Biol.**, 274: 481-490.

- Hoffmann O. (1890-94).** *Compositae*. Pp. 87-387. (In: Engler, A. & Prantl, K. (ed.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 4(5). Leipzig).
- Howis S., Barker N. and Mucina L. (2009).** Globally grown, but poorly known: species limits and biogeography of *Gazania* Gaertn. (*Asteraceae*) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequence data. **Taxon**, 58 (3): 871-882.
- Hsu K.J., Rya W.B.F. and Cita M.B. (1973).** Late Miocene Desiccation of the Mediterranean. **Nature**, 242: 240-244.
- Hubbard D. (2007).** How to Measure Anything: Finding the Value of Intangibles in Business. John Wiley & Sons, p. 46.
- Huelsenbeck J.P. (1995).** Performance of phylogenetic methods in gene introgression between species. **Evolution**, 55: 1325-1335.
- Huelsenbeck J.P. and Ronquist F. (2001).** MrBayes: Bayesian inference in phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17: 754-755.
- Iturralde-Vinent M.A. and MacPhee R.D.E. (1999).** Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, 238: 1-95.
- Jansen R.K. and J.D. Palmer. (1988).** Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the *Mutisieae* (*Asteraceae*). **Amer. J. Bot.**, 75: 751-764.
- Jansen R.K. and Kim K.J. (1996).** Implications of chloroplast DNA data for the classification and phylogeny of the *Asteraceae*. Pp. 317–339. (In: Hind D.J.N. and Beentje H.J., (eds.), *Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, 1994, vol. 1, *Compositae: Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew).

- Jansen R.K. and Palmer J.D. (1987).** A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (*Asteraceae*). **P. Natl. Acad. Sci. USA.**, 84: 5818-5822.
- Jansen R.K., Michaels H.J. and Palmer J.D. (1991a).** Phylogeny and character evolution in the *Asteraceae* based on chloroplast DNA restriction site mapping. **Syst. Bot.**, 16: 98-115.
- Jansen R.K., Michaels H.J., Wallace R.S., Kim K.J., Keeley S.C., Watson L.E. and Palmer J.D. (1991b).** Chloroplast DNA variation in the *Asteraceae*: phylogenetic and evolutionary implications. Pp. 252–279. (In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Doyle, J.J. (eds.), *Mol. Syst. of Plants*. Chapman & Hall, New York).
- Jeffrey C. (1978).** *Compositae*. Pp. 263–268. (In: Heywood, V.H. (ed.), *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, Oxford and London).
- Johnson L.A. and Soltis D.E. (1994).** *matK* DNA sequence and phylogenetic reconstruction in *Saxifragaceae* s.s. **Syst. Bot.**, 19: 143-156.
- Jones N., Ougham H. and Thomas H. (1997).** Markers and mapping: we are all geneticists now. **New Phytol.**, 137: 165-177.
- Jorgensen R.A., Cuellar R.E., Thomson W.F. and Kavanagh T.A. (1987).** Structure and variation in ribosomal RNA gene of pea. **Plant Mol. Biol.**, 8: 3-12.
- Jussieu A.L. [De Jussieu] (1789).** *Genera Plantarum, secundum ordines naturales disposita juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exaratam*. Paris.
- Kelch D.G. and Baldwin B.G. (2002).** Evidence for recent radiation of New World *Cirsium* based on comparison of rDNA transcribed spacer variation in the New World Clade and in Canada thistle, *C. arvense*. **Amer. J. Bot.**, 89 (abstract): 130.

- Kelch D.G. and Baldwin B.G. (2003).** Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (*Cirsium*, *Cardueae* - *Compositae*) based on ITS and ETS rDNA sequence data. **Mol. Ecol.**, 12: 141-151.
- Kim K.J. and Mabry T.J. (1991).** Phylogenetic and evolutionary implications of nuclear ribosomal DNA variation in dandelions (*Krigia*, *Lactuceae*, *Asteraceae*). **Plant. Syst. Evol.**, 177: 53-69.
- Kim K.J., Choi K.S. and Jansen R.K. (2005).** Two chloroplast DNA inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (*Asteraceae*). **Mol. Biol. Evol.**, 22: 1783-1792.
- Kim K.J., Jansen R.K., Wallace R.S., Michaels H.J. and Palmer J.D. (1992).** Phylogenetic implication of *rbcL* sequence variation in the *Asteraceae*. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 79: 428-445.
- Kim S., Crawford D.J., Jansen R.K. and Santos-Guerra A. (1999).** The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe *Sonchinae* (*Asteraceae*: *Lactuceae*). **Plant Syst. Evol.**, 215: 85-99.
- King K., Torres R.A., Zentgraf U. and Hemleben V. (1993).** Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of *Cucurbitaceae*. **J. Mol. Evol.**, 36:144-152.
- Kress W.J., Wundarck K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. and Janzen D.H. (2005).** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, 102: 8369-8374.
- Learn G.H.JR., Shore J.S., Furnier G.R., Zurawsky G. and Clegg M.T. (1992).** Constraints on the evolution of plastid introns: the group II intron in the gene encoding tRNA-Val(UAC). **Mol. Biol. Evol.**, 9: 856-871.
- Lee C. and Wen J. (2004).** Phylogeny of *Panax* using chloroplast *trnC-trnD* intergenic region and the utility of *trnC-trnD* in interspecific studies of plants. **Mol. Phyl. Evol.**, 31: 894-898.

- Lee J., Baldwin B.G. and Gottlieb L.D. (2002).** Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (*Compositae*, *Lactuceae*) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. **Amer. J. Bot.**, 89: 160-168.
- Lewontin R.C. and Birch L.C. (1966).** Hybridization as a source of variation for adaptation to new environments. **Evolution**, 20: 315-336.
- Linder C.R., Goertzen L.R., Heuvel B.V., Francisco-Ortega J. and Jansen R.K. (2000).** The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in *Asteraceae* and closely allied families. **Mol. Phyl. Evol.**, 14: 285-303.
- Lindley J. (1833).** Nixus plantarum, 20. Library of the Orchid Herbarium of Oakes Ames. Ridgway
- Linnè V.C. (1735).** Systema naturae, sive tria regna naturae systematicae proposita per classes, ordines, genera et species.
- Long E.O. and Dawid. (1980).** Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. Biochem.**, 49: 727-764.
- Lowe A., Harris S. & Ashton P., (2004).** Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application. 326 pp. Blackwell Publishing Company, Oxford, UK.
- Mai D.H. (1995).** Tertiäre Vegetationsgeschichte Europas. Methoden und Ergebnisse. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 691 pp
- Markos S. and Baldwin B.G. (2001).** Higher-level relationships and major lineages of *Lessingia* (*Compositae*, *Astereae*) based on nuclear rDNA internal and external transcribed spacer (ITS and ETS) sequences. **Syst. Bot.**, 26: 168-183.
- Martinov I.I. (1820).** *Asteraceae*. **Tekhno-Bot. Slovar.**, 55.

- Martinsen, G.D., T.G. Whitham, R.J. Turek, and P. Keim. (2001).** Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, 55(7), 2001, pp. 1325–1335
- Mayr E (1963).** Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Mayr E. (1969).** Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York, NY.
- Whitehead, P. (1990).** Systematics: an endangered species. *Syst. Zool.*, 39: 179-184.
- Mc Cauley D.E. (1995).** The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trend. Ecol. Evol.*, 10: 198-202.
- Mc Kenzie R.J., Mitchell S.D. and Barker N.P. (2006).** A new species of *Arctotis* (*Compositae, Arctotideae*) from kommetjie grassland in Eastern Cape Province, South Africa. *Bot. J. Linn. Soc.*, Pp: 581-588.
- Mc Neill J., Barrie F.R., Burdet H.M., Demoulin V., Hawksworth D.L., Marhold K., Nicolson D.H., Prado J., Silva P.C., Skog J.E., Wiersema J.H. and Turland N.J. (2006).** International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code).: adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005. *Regnum Vegetabile* 146, A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell, Liechtenstein.: [i]-xviii, 1-568.
- Mes H.M., Friesen N., Fritsch R.M., Klas M. and Bachmann K. (1997).** Criteria for sampling in *Allium* based on chloroplast DNA PCR-RFLP's. *Syst. Bot.*, 22(4): 701.
- Michel F., Kazuhiko U. and Haruo O. (1989).** Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - a review. *Genetics*, 82: 5-30.
- Miller J.T., Grimes J.W., Murphy D.J., Bayer J.R. and Ladiges P.Y. (2003).** A phylogenetic analysis of the *Acacieae* and *Ingeae* (*Mimosoideae*:

Fabaceae) based on *trnK*, *matK*, *psbA-trnH* and *trnL/trnF* sequence data. **Syst. Bot.**, 28: 558-566.

Moore W.S. (1977). An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. **Quart. Rev. Biol.**, 52: 263-277.

Morgan D.R. (2003). nr DNA External Transcribed Spacer (ETS) Sequence Data, Reticulate evolution, and the Systematics of *Machaeranthera* (*Asteraceae*). **Syst.Bot.**, 28 (1): 179-190.

Mullis K.B and Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Meth. Enz.**, 155: 335-50.

Mullis K.B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, Scientific American.

Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., Saiki R.K., Horn G. and Erlich H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. on Quantit. Biol.**, 51: 263

Musters W., Boon K., Van der Sande C.A.F.M., Van Heerikhuizen H. and Planta R.J. (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. **Embo J.**, 9: 3989-3996.

Nagano Y., Matsuno R. and Sasaki Y. (1991). Sequence and transcriptional analysis of the gene cluster *trnQ-zfpA-psaI-ORF231-petA* in pea chloroplasts. **Curr. Genet**, 20: 431-436.

Neuhaus H., Scholz A. and Link G. (1989). Structure and expression of a split chloroplast gene from mustard (*Sinapis alba*): ribosomal protein gene *rps16* reveals unusual transcriptional features and complex RNA maturation. **Curr. Genet.**, 15: 63-70.

Nickrent D.L. and Soltis D.E. (1995). A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 82: 208-234.

- Nixon K. (2002).** WinClada, ver. 1.00.08. www.cladistics.com. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 82: 208-234
- Nyffeler R. (2002).** Phylogenetic relationships in the cactus family (*Cactaceae*) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL/trnF* sequences. **Amer. J. Bot.**, 89: 312-326.
- Ohyama K., Fukuzawa H., Kochi T., Shirai H., Sano T., Sano S., nokuchi H. and Ozeki H. (1986).** Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. **Nature**, 322: 572-574.
- Olmstead R.G. and Palmer J.D. (1994).** Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **Amer. J. Bot.**, 81: 1205-1224.
- Oxelman B., Liden M. and Berglund D. (1997).** Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (*Caryophyllaceae*). **Plant Syst. Evol.**, 206: 393-410.
- Palmer J.D. (1985).** Comparative organization of chloroplast genomes. **Ann. Rev. Gen.**, 19: 325-354.
- Palmer J.D. (1991).** Plastid chromosomes: structure and evolution. (In: Bogorad L. and Vasil I.K. (ed.). *The Molecular Biology of Plastids*. pp. 5-53. Academic Press, San Diego, California).
- Panero J.L. (2007).** Compositae: Tribe Heliantheae. (In: Kadereit, J. W., Jeffrey, C. (Eds.), *Families and Genera of Vascular Plants*, vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp.440-477).
- Panero J.L. and Crozier B.S. (2008).** Tree of Life web project. *Asteraceae*. tolweb.org/Asteraceae/20780.
- Panero J.L. and Funk V.A. (2007).** New Infraclass taxa in *Asteraceae*. **Phytol.**, 89: 356-360.

- Panero J.L. and Funk V.A. (2008).** The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the *Asteraceae* revealed. **Mol. Phyl. Evol.**, 47: 757-782.
- Panero J.L. and Funk V.A. (2002).** Toward a phylogenetic subfamilial classification for the *Compositae*. **Proc. Biol. Soc. Wash.**, 115: 909-922.
- Patterson C. (1982).** Morphological characters and homology. (In: Joysey K.A., Friday A.E. (ed.), *Problems in Phylogenetic Reconstruction*. London: Academic Press, pp. 21-74).
- Patterson C. (1988).** Homology in classical and molecular biology, **Mol. Biol. Evol.**, 5: 603-625.
- Penny D., Hendy M.D. and Steel M.A. (1992).** Progress with methods for constructing evolutionary trees. **Trend. Ecol. Evol.**, 7: 73-79.
- Petrak F. (1917).** Die nordamerikanischen arten der gattung *Cirsium*. **Botanisches Centralblatt**, 35: 223-567.
- Pignatti S. (1982).** Flora d'Italia, vol.3. Edagricole. Bologna.
- Procaccini G. and Maltagliati F. (2004).** Methodological approaches to the analysis of genetic diversity in benthic organisms, *Methods for sampling and study of Mediterranean marine benthos*. **Biol. Mar. Medit.**, pp. 481-519.
- Provan J., Powell W. and Hollingsworth P.M. (2001).** Chloroplast microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. **Trend. Ecol. Evol.**, 16: 142-147.
- Rannala B. and Yang Z. (1996).** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **J. Mol. Evol.**, 43: 304-311.
- Raven P.H. and Axelrod D.I. (1974).** Angiosperm biogeography and past continental movements. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 61: 539-673.

- Reboud X. and Zeyl C. (1994).** Organelle inheritance in plants. **Heredity**, 72: 132-140.
- Ren, Hui, Lu, Li-Min, Soejima, Akiko, Luke, Quentin, Zhang, Dian-Xiang, Chen, Zhi-Duan and Wen (2011).** Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on the noncoding plastid *trnC-petN*, *trnH-psbA*, and *trnL-F* sequences. **Taxon**, 60: 629-637.
- Rieseberg, L.H. (1997).** Hybrid origins of plant species. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 28: 359-389.
- Rieseberg L.H and Carney SE. (1998).** Plant hybridization. **New Phytol.**, 140: 599-624.
- Rieseberg L.H. and Soltis D.E. (1991).** Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. **Evol. Trend. Plants**, 5: 65-84.
- Rieseberg L.H., Raymond D.M., Rosenthal Z., Lai K., Livingstone T., Nakazato J.L., Durphy A.E., Schwarzbach L.A., Donovan C. and Lexer T. (2003).** Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. **Science**, 301: 1211-1216
- Ritland K. and Clegg M.T. (1987).** Evolutionary analysis of plant DNA sequences. **Amer. Nat.**, 130: S74-S100.
- Sakai M., Kanazawa A., Fujii A., Thseng F.S., Abe J. and Shimamoto Y. (2003).** Phylogenetic relationships of the chloroplast genomes in the genus *Glycine* inferred from four intergenic spacer sequences. **Plant Syst. Evol.**, 239: 29-54.
- Sang T., Crawford D.J. and Stuessy T.F. (1997).** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). **Amer. J. Bot.**, 84: 1120-1136.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **P. Natl. Acad. Scien. USA**, 74: 5463-5467.

- Santalla M., Power J.B. and Davey M.R. (1998).** Genetic diversity in mungbean germplasm revealed by RAPD markers. **Plant Breeding**, 117: 473-478.
- Schaal B.A., Leverich W. J. and Nieto-Sotelo J. (1987).** Ribosomal DNA variation in the native plant *Phlox divaricata*. **Mol. Biol. Evol.**, 4: 611-621.
- Schemske D.W. (2000).** Understanding the origin of species. **Evolution**, **54**: 1069-1073.
- Schimper A.F.W. (1883).** Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. **Bot. Ztg.** 41: 105-114.
- Schmidt-Puchta W., Gunther I. and Sanger H.L. (1989).** Nucleotide sequence of the intergenic spacer (IGS) of the tomato ribosomal DNA. **Plant Mol. Biol.**, 13:251-253.
- Schönenberger J. and Conti E. (2003).** Molecular phylogeny and floral evolution of the *Penaeaceae*, *Oliniaceae*, *Rhynchoalycaceae*, and *Alzateaceae* (*Myrtales*). **Amer. J. Bot.**, 90: 293-309.
- Sclater J.G, Hellinger S. and Tapscott C (1977).** The paleobathymetry of the Atlantic ocean from the Jurassic to the present. **J. Geol.**, 85, 509-552.
- Severini C., Silvestrini F., Mancini P., La Rosa G. and Marinucci M. (1996).** Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. Quinque fasciatus* Say(Diptera: *Culicidae*). **Ins. Mol. Biol.**, 5: 181-186.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E. and Small R.L. (2005).** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **Amer. J. Bot.**, 92: 142-166.
- Shena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270: 467-470.

- Shneyer V.S. (2009).** DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. **Russian J. Genet.**, 45 (11): 1267- 1278.
- Simpson G.G. (1961).** Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, New York, NY. simulation. **Syst. Biol.**, 44: 17-48.
- Small J. (1919).** The origin and development of the *Compositae*. **New Phytol.**, 18: 129-176.
- Soller M. and Beckmann J.S. (1983).** Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theor. Appl. Genet.**, 67:25-33.
- Soltis D.E., Kuzoff R.K., Mort M.E., Zanis M., Fishbein M., Hufford L., Koontz J. and Orroyo M.K. (2001).** Elucidating deep-level phylogenetic relationships in *Saxifragaceae* using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 88: 669-693.
- Song Z.C., Zheng Y.H. and Li M.Y. (1999).** Paleogene palynostratigraphy. Pp. 141-265. (In: Song Z.C., Zheng Y.H., Li M.Y., Zhang Y.Y., Wang W.M., Wang D.N., Zhao C.B., Zhou S.F., Zhu Z.H. and Zhao. Fossil Spores and Pollen of China: The Late Cretaceous and Tertiary Spores and Pollen. Y.N., eds. Science Press, Beijing).
- Stace C.A. (1987).** Hybridization and the plant species. (In: Urbanska KM (ed) Differentiation patterns in higher plants. pp 115-127. Academic Press, New York).
- Stebbins G.L. Jr. (1959).** The role of hybridization in evolution. **Proc. Amer. Phil. Soc.** 103, 231-251
- Stebbins G.L. Jr. and Daly K. (1961).** Changes in variation patterns of *Helianthus* over a n eight- year period. **Evolution**, 15: 60-71.
- Stevens P.F. (2001).** Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 [and more or less continuously updated since]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. (Accessed March 27, 2008).

- Štorchova H. and Olson M.S. (2007).** The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non coding region in angiosperms. **Plant Syst. Evol.**, 268: 235-256.
- Stuessy T.F., Sang T. and De Vore M.L. (1996).** Phylogeny and biogeography of the subfamily *Barnadesioideae* with implications for early evolution of the *Compositae*. Pp. 463-490. (In: Hind D.J.N. and Beentje H.J. (eds.), Proceedings of the International *Compositae* Conference, Kew, 1994. Vol.1. *Compositae: Syst.*, Royal Botanic Gardens, Kew).
- Susanna A. and Garcia-Jacas N. (2007).** The tribe *Cardueae*. (In: J. Kadereit & K. Kubitzki (editors), *Compositae. The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Heidelberg).
- Susanna A., Garcia-Jacas N., Hidalgo O., Vilatersana R. and Garnatje T. (2006).** The *Cardueae* (*Compositae*) revisited: insights from ITS, trnL-trnF, and matK nuclear and chloroplast DNA analysis. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 93: 150-171.
- Susanna A., Garcia-Jacas N., Soltis D.E. and Soltis P.S. (1995).** Phylogenetic relationships in tribe *Cardueae* (*Asteraceae*) based on ITS sequences. **Amer. J. Bot.**, 82: 1056-1068.
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell H. and Hillis D. (1996).** Phylogenetic inference. (In: Hillis D.M., Moritz C. (ed.). *Mol. Syst.*, II. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 407-451).
- Sytsma K.J. and Schaal B.A. (1985).** Phylogenetics of the *Lisianthus skinneri* (*Gentianaceae*) species complex in Panama utilizing DNA restriction fragment analysis. **Evolution**, 39: 594-609.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. and Bouvet D.J. (1991).** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol. Biol.**, 17: 1105-1109.

- Takaiwa F., Oono K. and Sugiura M. (1985).** Nucleotide sequence of the 17S–25S spacer region from rice rDNA. **Plant Mol. Biol.**, 4: 355-364.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994).** CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, 22: 4673-4680.
- Thompson W.F. and Flavell R.B. (1988).** DNase I sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in wheat. **J. Mol. Biol.**, 204: 535-548.
- Tosh j., Davis A.P., Dessein S., Block de P., Huysmans S., Fay M.F., Smets E. and Robbrecht E. (2009).** Phylogeny of *Tricalysia* (*Rubiaceae*) and its relationship with allied genera based on plastid DNA data: resurrection of genus *Empogona*. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, 96:194-213.
- Tsudzuki J., Nakashima K., Tsudzuki T., Hiratsuka J., Shibata M., Wakasugi T. and Sugiura M. (1992).** Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of *trnQ*, *trnK*, *psbA*, *trnI* and *trnH* and the absence of *rps16*. **Mol. Gen. Genet.**, 232: 206-214.
- Turner B.L. (1977).** A new species of *Gaillardia* (*Asteraceae-Heliantheae*) from north-central Mexico and adjacent Texas. **The Southwest Association Naturalists**, 21: 539-541.
- Vamosi J.C. and Dickinson T.A. (2006).** Polyploidy and diversification: a phylogenetic investigation in *Rosaceae*. **Intern. J. Plant Sci.**, 167: 349-358.
- Van der Sande C.A.F.M., Kwa M., Van Nues R.W., Van Heerikui- Zen H., Raue H.A. and Planta R.J. (1992).** Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. **J. Mol. Biol.**, 223: 899-910.

- Volkov R., Kostishin S., Ehrendorfer F. and Schweizer D. (1996).** Molecular organization and evolution of the external transcribed rDNA spacer region in two diploid relatives of *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). **Plant Syst. Evol.**, 201:117-129.
- Wagenitz G. (1976).** Systematics and phylogeny of the *Compositae* (Asteraceae). **Plant Syst. Evol.**, 125: 29-46.
- Wagner Jr W.H. (1970).** Biosystematics and evolutionary noise. **Taxon**, 19:146-151.
- Wagner Jr W.H., (1969).** The role and taxonomic treatment of hybrids. **Bio-sciences**, 19:785-789.
- Wang Y., Liu J. and Miede G. (2007).** Phylogenetic origins of the Himalayan endemic *Dolomiaea*, *Diplazoptilon* and *Xanthopappus* (Asteraceae: Cardueae) based on three DNA regions. **Ann. Bot.**, 99: 311-322.
- Weber J.L. and Wong C. (1993).** Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Mol. Genet.**, 2: 1123-1128.
- Wendel F.J. and Doyle J.J. (1998).** Phylogenetic Incongruence: window into genome history and molecular evolution. (In: Soltis D.E., Soltis P.S., Doyle J.J. (ed.), Mol. Syst. of Plants II. Kluwee Academic Publishing UK, pp. 265-296).
- Werner K. (1976).** *Cirsium* Miller. (In: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., eds. Flora Europaea, Vol. 4. Cambridge: Cambridge University Press, 232-242).
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1991).** In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds Innis, M. A., Gelfand, D. H. and Sninsky, J. J.), pp. 315-322. Academic Press, New York.
- Wilson R.T., Peacock C. and Sayers A.R. (1984).** Aspects of reproduction in goats and sheep in South central Kenya. **Anim. Prod.**, 38: 363-368.

- Wolfe K.H., Morden C.W. and Palmer J.D. (1992).** Function and evolution of a minimal plastid genome from a non-photosynthetic parasitic plant. **P. Natl. Acad. Sci. USA.**, 89: 10648-10652.
- Xu D. H., Sakai A.J., Kanazawa M., Shimamoto A. and Shimamoto Y. (2000).** Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. **Theor. Appl. Genet.**, 101: 724-73.
- Yang Z. and Rannala B. (1997).** Bayesian Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: A Markov Chain Monte Carlo Method. **Mol. Biol. Evol.**, 14(7): 717-724.
- Zacharias E.H. and Baldwin B.G. (2010).** A Molecular Phylogeny of North American *Atripliceae* (*Chenopodiaceae*), with Implications for Floral and Photosynthetic Pathway. **Evol. Syst.**, 247:314-321.
- Zurawski G. and Clegg M.T. (1987).** Evolution of higher plant chloroplast DNA-coded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. **Ann. Rev. of Plant Physiol.**, 38: 391-418.

APPENDICE A

Elenco delle specie appartenenti al genere *Cirsium*, sect. *Eriolepis* (modif. da Werner, 1976).



C. boujartii (Piller & Mitterp.) Schultz Bip. Biennale. Foglie ricoperte da peluria o tomentose al di sotto; lobi da oblunghi a triangolari-lanceolati. Capolini in numero esiguo, di solito con 1-4 brattee sottostanti più brevi del capolino. Involucro max 35x50 mm, ricoperto da peluria o lanuginoso; le squame più esterne ricurve, quelle mediane patenti, con spine marginali (0,5-2 mm) e spinule setose sulla superficie interna della parte ricurva (fino a 0,7 mm). Corolla purpurea 20-26 mm; acheni 5-5,5 mm; pappo 20-24 mm.



C. bulgaricum D.C. Biennale, alta fra 60 e 100 cm. Foglie lanuginose sulla pagina inferiore; lobi da lanceolati a strettamente triangolari, con rigide spine apicali da 3 a 10, fino a 16 mm. Capolini in racemi o corimbi più o meno densi da 3 a 10, con 2, 6, fino a 9 brevi foglie sottostanti più corte o uguali ai capolini. Involucro ovoidale, globoso, 24-

35x22-35 mm, da scarsamente aracnoide-peloso a subglabro. Squame più esterne suberette; intermedie eretto-patenti, con spine marginali rigide (1-3,5 mm). Corolla purpurea 23-30 mm. Acheni 5-6 mm; pappo 19-22 mm.



C. ciliatum Moench. Biennale o perenne; alto fino a 150 cm. Foglie mediane auricolate amplessicaule, decorrenti per circa 1 cm sul fusto, ricoperte al di sotto da strato lanuginoso; lobi da oblunghi a triangolari-lanceolati, con una spina apicale di 2-10 mm. Capolini in numero esiguo, pedunculati o subsessili, con 1-3 brattee sottostanti più brevi del capolino. Involucro glabro o subglabro; le squame si assottigliano progressivamente dalla parte basale a quella distale, con spine marginali rigide molto dense (1-1,5 mm) e spine apicali di 2-7 mm. Le squame più esterne numerose e nettamente deflesse; quelle mediane patenti o eretto-patenti. Involucro max 35x40 mm; corolla purpurea 24-30 mm; acheni 4,5-5,5 mm; pappo 20-26 mm.



C. costae (Sennen & Pau) Petrak. Biennale, alta fra 20 e 80 cm. Foglie altamente auricolate-semiamplessicaule, brevemente setose sulla pagina superiore, scarsamente aracnoidi-lanate fino a tomentose sulla pagina inferiore; lobi da strettamente triangolari a lineari-triangolari, con spine apicali slargate da 3 a 12 mm. Capolini in racemi più o meno densi, con 3-5 foglie sottendenti con spina apicale, più corte o leggermente più lunghe dei capolini. Involucro glabro o scarsamente aracnoide-peloso, raramente scarsamente aracnoide-lanato 35-45x35-40, fino a 50 mm. Brattee intermedie con apice da leggermente slargato a spinoso-dentellato, con spine apicali rigide tra 2 e 4 mm. Corolla purpurea 34-38 mm. Acheni 5-6 mm; pappo 21-30 mm.



C. decussatum Janka. Biennale, alta fra 60 e 150, fino a 200 cm. Foglie lanuginose sulla pagina inferiore; lobi da lineari-lanceolati ad oblunghi, con rigide spine apicali da 2 a 12 mm. Capolini solitari o pochi, lungo-pedunculati con 5-16 foglie sottostanti uguali o più lunghe dei capolini. Involucro 30-50x40-50, fino a 60 mm, da densamente aracnoide-

lanato a scarsamente aracnoide-peloso. Squame patenti, divise in una porzione basale slargata ed una stretta parte distale con remote spine marginali (0,5-1,7mm), la porzione ricurva minuziosamente spinulosa-scabra sulla superficie più interna ed apice liscio; squame intermedie leggermente slargate nella porzione apicale ovvero con la porzione apicale purpurea larga 1-2 mm, con margine da spinuloso-ciliato a subscarioso-fimbriato e debole spina apicale da 1,5 a 4, fino a 7 mm. Corolla purpurea 27-42 mm. Acheni 5-7 mm; pappo 22-34 mm.



***C. echinatum* (Desf.) DC.** Perenne; 15-40 cm. Foglie mediane decorrenti per circa 1 cm sul fusto, ricoperte al di sotto da strato lanuginoso, pennatosette; segmenti profondamente divisi in due lobi divaricati da triangolari ad oblunghi-triangolari, con una spina apicale lunga fino a 15 mm. Capolini in corimbo, con 2-8 brattee sottostanti in generale più lunghe del capolino. Involucro max 40x45 mm. Corolla purpurea 25-40 mm; acheni 5-6,5 mm; pappo lungo quanto la corolla.



C. eriophorum (L.) Scop. Biennale; di altezza compresa tra 40 e 250 cm. Foglie dalla lamina setosa, ricoperte al di sotto da strato lanuginoso o tomentoso; lobi lanceolati con una spina apicale lunga fino a 25 mm. Capolini in numero esiguo, più o meno peduncolati, in un lasso racemo o corimbo, con un numero variabile di brattee sottostanti in genere più brevi del capolino. Involucro densamente bianco-lanuginoso, raramente sub glabro. Squame lisce o con brevi spine marginali nella parte distale, le più esterne patenti o ricurve, le mediane con o senza una un'appendice rombica o lanceolata distale e in genere una debole spina apicale (fino a 5 mm). Involucro max 30x70 mm; corolla purpurea 25-44 mm; acheni 4,5-6 mm; pappo 20-33mm.



C. ferox (L.) DC. Biennale; 60-120 cm. Foglie auricolate-semiamplessicaule, ricoperte da *setae* patenti 1-7 mm e al di sotto da strato lanuginoso o tomentoso; lobi da lineari-oblungi a triangolari-oblungi, con spine apicali di 4-15 mm. Capolini in corimbo, con

10-20 brattee sottostanti di lunghezza uguale o leggermente superiore al capolino. Involucro ricoperto da peluria o subglabro; le squame si assottigliano o si ampliano leggermente verso l'apice, denticolato o con un'appendice ciliata e debole spina patente o eretto-patente di 4-7 mm. Involucro max 45x40 mm; corolla generalmente bianca 30-38 mm; acheni 4,5-6 mm; pappo 24-29 mm.



C. furiens Griseb. & Schenk. Biennale; 80-150 cm. Foglie lanose-tomentose sulla pagina inferiore; lobi oblunghi lanceolati o ellittici, con spine apicali di 4-15 mm. Capolini in un denso corimbo, con 1-8 brattee di lunghezza da inferiore a leggermente superiore al capolino. Involucro ricoperto di peluria o glabro; le squame più esterne da eretto-patenti a ricurve, le mediane da suberette a patenti, con spine marginali deboli da 1,5 a 3 mm, da 3 a 5 volte più lunghe dell'ampiezza della squama, con spinule setose fino a 1,8 mm sulla superficie interna della parte ricurva; apice non slargato, con una debole spina apicale da 2 a 4,5 mm. Involucro max 32x35 mm; corolla bianca o rossa 19-26 mm; acheni 4-5,5 mm; pappo 17-24 mm.



C. giraudiasii Sennen & Pau, Biennale; 20-80 cm. Foglie auricolate-semiamplessicaule, ricoperte di peluria al di sotto; lobi da oblunghi a lanceolati o leggermente triangolari, con spine apicali di 3-12 mm. Capolini in racemo composto, con 5-12 brattee di solito più lunghe del capolino. Involucro ricoperto da peluria o glabro; le squame mediane con apice ciliato, con spina apicale da 2 a 4 mm. Involucro max 40x45 mm; corolla purpurea 24-35 mm; acheni 5-6 mm; pappo 21-30 mm.

C. grecescui Rouy. Biennale; 20-200 cm. Foglie lanuginose sulla pagina inferiore raramente tomentose o pelose; lobi da lanceolati a oblunghi-ellittici, più o meno ottusi, con spine apicali di 3-20 mm. Capolini solitamente in numero esiguo, in racemo o corimbo, pedunculati, con 1-10 brattee. Involucro in genere molto lanuginoso; le squame possiedono spinule marginali, le squame più esterne da patentì a ricurve; le squame mediane patentì possiedono spine marginali lunghe fino a 1,2 mm e portano sull'apice un'appendice da rombica a ellittica ampia (1,5 a 3,5 mm); spine apicali lunghe fino a 4 mm. Involucro max 45x60 mm; corolla purpurea 24-39 mm; acheni 4,5-6,5 mm; pappo 22-32 mm.

C. heldreichii Halácsy. Biennale; alta fra 15 e 100 cm. Fusto molto lanuginoso. Lobi fogliari da lineari-lanceolati a oblunghi-lanceolati, con robuste spine apicali da 6-25 mm. Capolini solitari o in corimbo composto, pedunculati, con 2-6 brattee uguali o più lunghe del capolino. Squame dell'involucro con spine mediane che si restringono progressivamente verso l'apice densamente spinuloso e dotato di una spina apicale lunga da 2 a

6 mm. Involucro max 35x60 mm; corolla generalmente bianca 27-30 mm; acheni 5-6 mm; pappo 19-25 mm.



C. hypopsilum Boiss. & Heldr. In Boiss. Biennale; 40-100 cm. Fusto molto ramificato, con peli crespi, aracnoide-lanato verso l'apice. Foglie dalla lamina da glabra ad aracnoide-lanata sulla pagina inferiore; lobi da lineari-triangulari a lineari-lanceolati, con rigide spine apicali da 5 a 10, fino a 20 mm. Capolini numerosi, in racemi stretti, molto ramificati, con 3, 5, fino a 8 brattee sottostanti pennatosette e marginalmente squarrosospinose, una volta e mezzo-tre volte la lunghezza dei capolini. Involucro 20-27x17-30 mm, scarsamente aracnoide-peloso a lanato o raramente subglabro. Le brattee con margine spinoso-dentellato, le più esterne erette; le intermedie eretto-patenti, distintamente slargate all'apice e con spina apicale (1,5-4 mm). Corolla biancastra 18-25 mm con margine diviso a metà. Acheni 4,5-5,5 mm; pappo 16-20 mm.



C. italicum (Savi) DC. Biennale o annuale; 15-60 cm. Fusto in genere molto ramificato. Foglie decorrenti per circa metà della lunghezza dell'internodo, tormentose-lanuginose o raramente glabre al di sotto; lobi lineari-triangolari o triangolari, con robuste spine apicali da 4 a 12 mm. Capolini in genere concentrati all'apice del fusto e dei rami con 3-8 brattee molto più lunghe del capolino. Involucro ricoperto da peluria subglabro; squame appressate, oblunghe con *vittae* e spine apicali patenti di 2.5-7 mm, le più interne con un'appendice setolosa e minuta. Involucro max 20x15 mm; corolla purpurea 12-14 mm, tubo della corolla lungo la metà del lembo; acheni 2,5-3 mm; pappo 9-11 mm.



C. lacaitae Petrak. Biennale; alta 60-150 cm. Foglie ricoperte da peluria o raramente glabre sulla pagina inferiore; lobi da lineari a lineari-lanceolati, con robuste spine apicali da 4-13 mm. Capolini in corimbo solitamente in numero esiguo, con 1-4 brattee più brevi del capolino. Involucro ricoperto da peluria o subglabro; squame da eretto-patenti a suberette, le mediane spesso slargate verso la parte distale purpurea e denticolata, sovrastata da una spina di 2-5 mm. Involucro max 40x50 mm; corolla purpurea 29-35 mm, tubo della corolla più lungo del lembo; acheni 5-6 mm; pappo 25-30 mm.



C. laniflorum (Bieb.) Fischer. Perenne; 30-80 cm. Foglie subcoriacee, piatte o ondulate, lanuginose sulla pagina inferiore, le mediane pennatifide. Segmenti con 1-3 lobi o denti disuguali, da ovati a oblunghi o da ampiamente triangolari a lineari-lanceolati, con spine apicali da 1-10 mm. Capolini solitari o in gruppi da 2-4 su brevi rami, con 1-5 brattee più brevi del capolino. Involucro ricoperto da peluria o lanuginoso; squame divise in una parte basale più ampia e una parte apicale generalmente patente, lisce o con spine marginali 0,2-0,8 mm, sovrastate da una rigida spina apicale di 2-3,5 mm. Involucro max 30x30 mm; corolla purpurea o rosea 20-30 mm, tubo delle corolla più lungo del lembo; acheni 5-5,5 mm; pappo 15-22 mm.



C. ligulare Boiss. Biennale, alta fra 20 e 200 cm. Foglie lanuginose o ricoperte da peluria al di sotto; lobi leggermente lanceolati o oblunghi-triangolari, con spine apicali da 3-20 mm. Capolini solitamente in numero esiguo, in racemo o corimbo, pedunculati, con

1-10 brattee. Involucro da lanuginoso a glabro; le squame possiedono di solito spinule marginali e con la parte ricurva spinulosa sulla superficie interna; le brattee più esterne da patenti a ricurve, le mediane patenti, e che si slargano verso la parte distale. Esse portano sull'apice un'appendice fimbriata o laciniata ampia da 1,5 a 5,5 mm che porta spinule distribuite in file a formare un anello. Involucro max 45x60 mm; corolla purpurea 24-39 mm; acheni 4,5-6.5 mm; pappo 22-32 mm.



C. lobelii Ten. Biennale; 20-50 cm. Foglie lanuginose sulla pagina inferiore; lobi da lineari-triangolari a lanceolati portanti una spina apicale da 4 a 20 mm. Capolini solitari o in numero esiguo concentrati all'apice del fusto, con 3-6 brattee sottostanti di lunghezza uguale o leggermente superiore al capolino e numerose altre brattee più brevi del capolino. Involucro lanuginoso, squame esterne suberette, squame mediane eretto-patenti, che si slargano in un'appendice fimbriata e denticolata in modo irregolare con una spina apicale 2,5 a 5 mm. Involucro max 50x50 mm; corolla purpurea 25-35 mm, tubo della corolla più lungo del lembo; acheni 5 mm; pappo 21-31 mm.



C. morinifolium Boiss. & Heldr. Biennale; 30-100 cm. Fusto molto ramificato spesso ricoperto da peluria. Foglie glabre o ricoperte da peluria sulla pagina inferiore; lobi da lineari-triangulari a triangulari con una spina apicale da 7 a 15 mm. Capolini numerosi in racemo composto o corimbo, con 8-12 brattee sottostanti spinose lunghe 2-4 volte la lunghezza del capolino. Involucro lanuginoso o ricoperto da peluria, raramente subglabro; squame patenti, le mediane gradualmente assottigliate verso l'apice liscio e sormontato da una spina apicale di 1-2 mm. Involucro max 25x35 mm; corolla bianca 20-26 mm; pappo 16-20 mm.



C. morisianum Rchb. Biennale; 20-150 cm. Foglie auricolate-semiamplessicaule, lanuginose o glabre al di sotto, lobi da lineari-triangulari a lanceolati-triangulari, con una spina apicale di 5-23 mm. Capolini in racemo più o meno composto, con 1-5 brattee sottostanti più brevi o delle stessa lunghezza del capolino. Involucro lanuginoso o raramente glabro; squame gradualmente assottigliate verso la spina apicale patente o ricurva di

10-30 mm. Involucro max 50x60 mm; corolla purpurea 30-35 mm; acheni 5-6 mm; pappo 20-26 mm.



C. odontolepis Boiss. ex DC. Biennale; alta da 20 a 150 cm. Foglie con lunghe setole patenti sulla pagina superiore, scarsamente lanugineose o pelose al di sotto; lobi da strettamente triangolari ad oblungi, con una spina apicale slargata da 5 a 15 mm. Parecchi capolini, brevemente pedunculati, raramente singoli, con 5-16 brattee sottostanti squaroso-spinose più lunghe del capolino. Involucro 30-45x25-50 mm da scarsamente peloso a lanuginoso; squame con margine liscio; le più esterne suberette, le intermedie con appendice da combica a lanceolata, scarioso fimbriata e debole spina apicale di 1-4 mm; spine assenti sulla superficie più interna. Corolla purpurea o bianca 33-42 mm; acheni 4,5-6 mm; pappo 25-31 mm.



C. polycephalum DC. Biennale; 60-100 cm. Foglie lanugineose al di sotto, lobi da triangolari a lanceolati, con una spina apicale rigida da 3-16 mm. Capolini in numero supe-

riore a 10 in racemo composto o corimbo, con 6-12 brattee sottostanti di lunghezza uguale o superiore al capolino. Involucro subcilindrico, squame erette, progressivamente ristrette verso l'apice suberetto, sormontato da una spina apicale 1-3,5 mm. Involucro max 23x15 mm; corolla solitamente bianca 13-16 mm.; acheni 3,5-4,5 mm; pappo 13-14 mm.



C. richterianum Gillot. Biennale; 15-60 cm. Foglie auricolate-semiamplessicaule, lanuginose o glabre al di sotto, lobi da lineari-triangulari a lanceolati-triangulari, con una spina apicale da 5 a 23 mm. Capolini in racemo composto, con 1-5 brattee sottostanti pennatifide spinose di lunghezza fino al triplo della lunghezza del capolino. Involucro lanuginoso; squame gradualmente assottigliate verso la spina apicale patente o eretto-patente di 4-8 mm. Involucro max 50x60 mm; corolla purpurea 25-31 mm; acheni 5-6 mm; pappo 20-26 mm.



C. scabrum (Poiret) Dur. et Barr. Perenne; alta da 60 a 400 cm. Foglie molto grandi, decorrenti per 1 cm, piatte, lanuginose o tomentose sulla pagina inferiore e pennatifide; segmenti triangolari con 2-3 lobi o denti triangolari, con robuste spine apicali da 3 a 10 mm. Capolini 1-3 in racemo composto, con 3-6 brattee più brevi o della stessa lunghezza del capolino. Involucro ricoperto da peluria o lanuginoso; squame appressate all'involucro, che si assottigliano verso l'apice eretto-patente di 0,5-2 mm. Involucro max 35x26 mm; corolla rosea 22-28 mm; acheni 4,5-5 mm; pappo 17-22 mm.



C. serrulatum (Bieb.) Fischer . Biennale o perenne; alta fino a 150 cm. Foglie mediane auricolate-amplessicauli, non decorrenti ovvero decorrenti per circa 0,5 cm sul fusto, ricoperte al di sotto da strato lanuginoso; lobi delle foglie intermedie da oblunghi-ellittici a lanceolati, con una spina apicale di 2-10 mm. Capolini raggruppati in brevi rami, in un corimbo; involucro 20-35x20-35 mm con 1-3 brattee sottostanti più brevi del capolino. Squame con spinule marginali da 0,2 a 0,8 mm meno dense e morbide nonché esili spine apicali 2-4,5 mm. Le squame più esterne meno numerose, eretto-patenti o raramente patenti-ricurve. Corolla purpurea 24-30 mm; acheni 4.5-5.5 mm; pappo 20-26 mm.



C. tenoreanum Petrak. Biennale; 15-100 cm. Foglie lanuginose o tomentose al di sotto, lobi da lineari-triangolari a lineari-lanceolati, con una robusta spina apicale di 3-15 mm. Capolini in un denso corimbo, generalmente numerosi, con 2-8 brattee sottostanti di lunghezza uguale o leggermente superiore al capolino. Involucro 30x30 mm, lanuginoso, squame patenti, le mediane con un'appendice rombica e purpurea ciliato-fimbriata e una debole spina apicale da 1,5 3,5 mm.; corolla purpurea 17-28 mm, tubo della corolla della stessa lunghezza del lembo; acheni 5-6 mm; pappo 16-22 mm.



C. vallis-demoniis Lojac. Biennale ; 40-100 cm. Foglie lanuginose o glabre al di sotto, lobi da lineari-triangolari a lineari-lanceolati, con una robusta spina apicale da 5 a 20 mm. Capolini in numero esiguo in un corimbo terminale, con 10 brattee sottostanti spinose di lunghezza superiore al capolino. Involucro max 40x40 mm, lanuginoso; squame mediane con un'appendice fimbriata o spinulosa-ciliata all'apice e spina da 1.5 a 4 mm.

Corolla bianca o purpurea 23-31 mm, lembo della corolla diviso per $\frac{3}{4}$ della sua lunghezza; acheni 5.5-6.5 mm; pappo 20-29 mm.



Cirsium vulgare (Savi) Ten. Biennale; da 20 a 300 cm. Foglie decorrenti per l'intero internodo, tormentose o ricoperte da peluria sulla pagina inferiore; lobi lanceolati, triangolari o ellittici-lanceolati, con deboli o robuste spine apicali di 2-15 mm. Capolini peduncolati in racemo composto o corimbo; in genere sprovvisti di brattee. Involucro max 40x40 mm, ricoperto da peluria o lanuginoso, raramente subglabro; squame assottigliate progressivamente verso l'apice dotato di spine 2-3,5 mm. Corolla purpurea 26-36 mm; acheni 3,5-5 mm; pappo 20-30 mm.