

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA



**DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA**

XXV Ciclo

**“Rapporti evolutivi nel genere *Pancratium* L. nel bacino del  
Mediterraneo“**

**Tutor**

*Prof. Aldo Moretti*

**Dottoranda**

*Dott.ssa Antonietta Di Maio*

**Co-tutor**

*Dott.ssa Olga De Castro*

**Coordinatore**

*Prof. Luciano Gaudio*

# INDICE

## INTRODUZIONE

<b>Capitolo 1 – Scopo del lavoro</b>	pag.6
1.1 <u>Obiettivo I</u> . Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere <i>Pancratium</i> L. (Amaryllidaceae) presenti nel bacino del Mediterraneo	pag.7
1.2 <u>Obiettivo II</u> . Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in <i>Pancratium maritimum</i> L.	pag.7
<b>Capitolo 2 – La famiglia delle Amaryllidaceae</b>	pag.9
<b>Capitolo 3 – Il genere <i>Pancratium</i> L.</b>	pag.11
<b>Capitolo 4 – <i>Pancratium maritimum</i> L.</b>	pag.14
<b>Capitolo 5 – Strumenti d’indagine: i marcatori molecolari</b>	pag.18
5.1 Il DNA plastidiale	pag.19
5.1.1 Il gene <i>ndhF</i>	pag.19
5.1.2 Il gene <i>rbcL</i>	pag.20
5.1.3 La regione <i>trnL</i> <sup>(UAA)</sup> - <i>F</i> <sup>(GAA)</sup>	pag.21
5.2 Il DNA nucleare	pag.22
5.2.1 I microsatelliti	pag.23
5.2.2 Cenni sui protocolli di isolamento dei microsatelliti	pag.24

## MATERIALI E METODI

<b>Capitolo 6 – <u>Obiettivo I</u></b>	pag.26
6.1 Campioni analizzati	pag.26
6.2 Estrazione del DNA genomico	pag.26
6.3 Amplificazione e sequenziamento	pag.27
6.4 Analisi dei dati	pag.28
<b>Capitolo 7 – <u>Obiettivo II</u></b>	pag.31
7.1 Campionamento delle popolazioni	pag.31

---

7.2 Isolamento dei loci microsatellitari	pag.31
7.2.1 Costruzione e arricchimento della libreria gnomica	pag.31
7.2.2 Disegno dei <i>primer</i> e amplificazione	pag.33
7.2.3 Analisi del polimorfismo dei loci isolati	pag.34
7.3 <i>Screening</i> delle popolazioni attraverso i microsatelliti	pag.35
7.3.1 Stime di diversità genetica	pag.36
7.3.2 Equilibrio di Hardy-Weinberg	pag.36
7.3.3 Statistiche F di Wright	pag.36
7.3.4 AMOVA	pag.37

## RISULTATI

### Capitolo 8 – Obiettivo I pag.39

8.1 Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere <i>Pancratium</i> L. usando i marcatori plastidiali	pag.39
--	--------

### Capitolo 9 – Obiettivo II pag.42

9.1 Isolamento dei loci microsatellitari	pag.42
9.1.1 Costruzione e arricchimento della libreria gnomica	pag.42
9.1.2 Analisi degli indici di variabilità genetica nei loci isolati	pag.43
9.2 <i>Screening</i> delle popolazioni attraverso i microsatelliti	pag.43
9.2.1 Stime di diversità genetica	pag.43
9.2.2 Equilibrio di Hardy-Weinberg	pag.44
9.2.3 Statistiche F di Wright	pag.44
9.2.4 AMOVA	pag.45

## DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

### Capitolo 10 – Obiettivo I: Indagine filogenetica e biogeografica delle specie

appartenenti al genere *Pancratium* L. (Amaryllidaceae) presenti nel

bacino del Mediterraneo	pag.47
-------------------------	--------

**Capitolo 11 – Obiettivo II: Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in**

*Pancratium maritimum* L. pag.54

**FIGURE** pag.59

**TABELLE** pag.69

**APPENDICI** pag.78

**BIBLIOGRAFIA** pag.92

# INTRODUZIONE

# Capitolo 1

## Scopo del lavoro

Oggetto iniziale del progetto di dottorato è stato lo studio dei rapporti evolutivi tra le specie appartenenti al genere *Pancratium* L. (Amaryllidaceae) presenti nel bacino del Mediterraneo. Tale genere appartiene alla famiglia delle Amaryllidaceae ed include circa 20 specie di piante perenni, erbacee e bulbose presenti in Asia, Africa ed Europa (Mabberley, 2008). Attualmente non sono stati effettuati studi approfonditi sulla filogenesi interspecifica di *Pancratium* e i pochi contributi presenti in letteratura risultano non esaustivi. Infatti gli unici studi di filogenesi rintracciabili sono a livello di famiglia e utilizzano un numero esiguo di specie appartenenti al genere *Pancratium* (Meerow et al. 1999, 2000, 2006), per le quali non si è in grado di risalire ai loro rapporti evolutivi avvenuti nel bacino del Mediterraneo.

Dai dati di filogenesi ottenuti nella prima fase di questo progetto è risultato molto interessante *P. maritimum* L. per la sua particolare nicchia ecologica e per l'ampiezza del suo areale di distribuzione che si estende in tutto il bacino del Mediterraneo fino al Mar Nero e al Mar Caspio, includendo anche parte delle coste Atlantiche. Inoltre, tale pianta oltre ad essere utilizzata a scopo ornamentale è anche un'importante fonte di principi attivi tra cui una vasta serie di alcaloidi e alginati che presentano interessanti proprietà farmacologiche. Purtroppo la presenza di questa specie, una volta cospicua, attualmente si è sensibilmente ridotta a causa dell'intervento antropico, tanto che la sua scomparsa da regioni anche molto estese è un rischio reale.

A tal proposito, le attività del mio progetto di dottorato sono state finalizzate al conseguimento di due obiettivi principali:

- **obiettivo I** - indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere

*Pancratium* presenti nel bacino del Mediterraneo.

- **obiettivo II** - caratterizzazione di marcatori microsatellitari in *P. maritimum*.

## **1.1 Obiettivo I: Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere *Pancratium* L. presenti nel bacino del Mediterraneo**

Nella prima fase della ricerca, ci si è proposti di chiarire la filogenesi e la biogeografia delle specie appartenenti al genere *Pancratium* presenti nel Bacino del Mediterraneo e nelle arie adiacenti.

Nel presente progetto l'attenzione è stata focalizzata principalmente sulle specie di *Pancratium* presenti nel Mediterraneo, in Africa e su alcune specie asiatiche.

A tal proposito si è proceduto al campionamento di singoli individui delle specie in esame e all'amplificazione e al sequenziamento di quattro marcatori presenti nel genoma plastidiale. Le regioni scelte per le analisi molecolari sono state selezionate in base a studi di filogenesi delle Amaryllidaceae presenti in letteratura (Meerow et al., 1999, 2006; Meerow & Snijman, 2006) e includono: i geni *ndhF* e *rbcL*, l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>.

La filogenesi è stata eseguita utilizzando un'analisi cladistica attraverso approcci di massima parsimonia (MP, Farris et al., 1970), di massima probabilità (ML, Felsenstein, 1981) e attraverso l'inferenza Bayesiana (BI, Mau et al., 1999). Inoltre è stata svolta un'analisi di dispersione-vicarianza per chiarire gli eventi biogeografici che hanno condotto all'attuale distribuzione delle specie analizzate di *Pancratium*.

## **1.2 Obiettivo II: Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in *Pancratium maritimum* L.**

Nella seconda fase del progetto di dottorato ci si è proposti di sviluppare un set di marcatori microsatellitari da utilizzare per la caratterizzazione genetica delle popolazioni di *P. maritimum* che risulta attualmente seriamente minacciato. Infatti, le modificazioni ambientali e l'intervento

dell'uomo stanno causando un progressivo rimpicciolimento delle aree occupate dalla specie e a un depauperamento delle sue popolazioni.

Per questo motivo risulta di fondamentale importanza lo studio della variabilità genetica e della sua distribuzione tra le popolazioni di tutto l'areale. Ciò potrebbe fornire un quadro completo dello stato di salute di questa pianta e potrebbe essere utile in futuro per progettare programmi di conservazione della sua diversità genetica e della "possibile" capacità di adattamento ai cambiamenti del suo habitat.

Per effettuare tali studi si è deciso di utilizzare i microsatelliti nucleari (nrSSR, *short sequence repeat in nuclear genome*) poiché attualmente sono considerati dei buoni strumenti in studi di genetica di popolazione (Guichoux et al., 2011).

A tal proposito in questa fase della ricerca si è proceduto secondo le seguenti tappe:

- 1) il campionamento delle popolazioni di *P. maritimum* provenienti da zone che potessero rispecchiare l'intero areale del bacino del Mediterraneo;
- 2) lo sviluppo di un protocollo rapido ed economico per la costruzione di una libreria di nrSSR per genomi vegetali;
- 3) caratterizzazione di 21 loci nrSSR specifici per *P. maritimum*;
- 4) *screening* delle popolazioni di *P. maritimum* attraverso i loci nrSSR ottenuti.

Tale fase della ricerca è stata finanziata in parte dalla Fondazione Peretti nell'ambito del Progetto 2012-83.



## Capitolo 2

### La famiglia delle Amaryllidaceae

La famiglia delle Amaryllidaceae è ben contraddistinta dal caratteristico fiore epigino simile ai gigli. Secondo quanto riportato da Meerow & Snijman (1998), la famiglia delle Amaryllidaceae consta di circa 800 specie appartenenti a 59 generi. Il suo centro di diversità è in Sud America (28 generi) e in Africa (19 generi). Otto generi crescono nelle aree del Mediterraneo e nelle regioni temperate dell'Asia, mentre solo *Crinum* L., si ritrova sia nel Nuovo che nel Vecchio Mondo. Le Amaryllidaceae costituisce uno dei gruppi culmine dell'ordine delle Asparagales (Dahlgren et al, 1985; Fay e Chase, 1996). Tale famiglia è probabilmente più strettamente collegata alle Alliaceae (anticamente Liliaceae) e alle Hyacinthaceae che alle Hypoxidaceae, Agavaceae, Haemodoraceae o Alstroemeriaceae, con le quali era stata precedentemente riunita. Le Amaryllidaceae si distinguono dalle Liliaceae per il loro ovario infero, oltre che per le infiorescenze umbelliformi con le caratteristiche brattee (spate) (Hutchinson, 1959). Le specie appartenenti a questa famiglia sono erbacee perenni, per lo più bulbose, raramente rizomatose presenti in diversi habitat.

I lavori di Pax (1887) e Pax & Hoffmann (1930) hanno fornito una revisione globale della famiglia delle Amaryllidaceae. Gli autori, considerando il tipo di habitat delle piante e il tipo di infiorescenza, hanno riclassificato le Amaryllidaceae in 4 sottofamiglie: Amaryllidoideae, Agavoideae, Hypoxidoideae e Campanematoideae. Inoltre, prendendo in considerazione la presenza o l'assenza della corona hanno suddiviso le Amaryllidoideae in 2 tribù: Amaryllideae e Narcisseae. Le Amaryllideae sono state ulteriormente suddivise in 6 sottotribù; mentre le Narcisseae sono state suddivise in 5 sottotribù. Gli autori avevano incluso il genere *Pancratium* L. all'interno della sottotribù Eucharidinae della tribù delle Narcissae. Successivamente la classificazione di Hutchinson (Hutchinson, 1934, 1959) ha rappresentato la prima ridefinizione cruciale delle Amaryllidaceae, definendo il carattere unificante della famiglia l'infiorescenza umbellata sottesa da

un involucro di una o più spate. Hutchinson ha considerato entrambi i caratteri vegetativi e fiorali per classificare la famiglia in 13 tribù e ha incluso *Pancratium* all' interno della tribù Eucharideae. Ad oggi però, ha guadagnato ampi consensi la classificazione che considera il genere *Pancratium* appartenente alla tribù Pancratieae delle Amaryllidaceae s.str.. a causa della presenza di molte false corone formate dalla fusione basale dei filamenti staminali (Dahlgren et al, 1985;. Meerow, 1995; Meerow & Snijman, 1998; Müller-Doblis & Müller-Doblis, 1996; Traub, 1936).

## Capitolo 3

### Il genere *Pancratium* L.

Il genere *Pancratium* L. appartiene alla famiglia delle Amaryllidaceae. Tale genere è stato descritto per la prima volta da Linneo in “Species Plantarum” (1753) e a oggi comprende specie di piante perenni, erbacee e bulbose, presenti in Asia, Africa ed Europa (Mabberley 2008).

Nel descrivere il genere, Linneo (1753) aveva considerato solo pochi caratteri morfologici (la corona staminale e fiori bianchi); secondo questa prima classificazione, il genere *Pancratium* comprendeva piante presenti sia nel Vecchio sia nel Nuovo Mondo. In seguito sono stati creati nuovi generi, come: *Eurycles* Salisb. ex Schult. & Schult. f., *Hymenocallis* Salisb., *Proiphys* Herb, nei quali sono confluite le piante presenti nel nuovo Mondo che Linneo aveva erroneamente inserito nel genere *Pancratium*.

Secondo vari studi filogenetici basati sulle sequenze del DNA plastidiale (Dahlgren et al. 1985, Meerow 1995, Meerow et al. 1999, 2000, 2006), il genere *Pancratium* è collegato ad altri generi di Amaryllidaceae Eurasiatiche che sono: *Galanthus* L., *Leucojum* L., *Lycoris* Herb., *Narcissus* L. e *Sternbergia* Waldstein & Kitaibel. Questi generi costituiscono un cluster monofiletico che apparentemente non ha supporto morfologico, ma che risulta essere sister al clado che include la maggior parte dei generi delle Amaryllidaceae (*Hymenocallis*, *Eucharis*, *Habranthus* Herb., *Zephyranthes* Herb., *Hippeastrum* Herb. e *Griffinia* Ker-Gawl.) [(Fig. 1) (Meerow et al. 2006)]. *Pancratium* è il genere più diffuso tra quelli presenti nel clado Euroasiatico delle Amaryllidaceae e comprende piante che producono fiori vistosi, bianchi e profumati con perigonio centrale, paracolla a forma di tubo e stami sporgenti e inseriti tra i denti della paracolla (El-Hadidy et al., 2012).

Attualmente, la filogenesi intragenerica di *Pancratium* nel Mediterraneo e nelle aree adiacenti non è stata ancora studiata e ci sono informazioni frammentarie e discordanti circa la nomenclatura

e il numero delle specie incluse nel genere (20 spp., Walters et al., 1986; 15 spp., Willis, 1988; 20 spp., Mabberley, 2008; 18 spp., *Amaryllidaceae website*, <http://www.amaryllidaceae.org/>). Analisi incrociate nelle banche dati presenti *online* e delle flore locali e *checklist* (per esempio Tackholm & Drar, 1954; Mill, 1984; Feinbrun-Dothan, 1986; Hansen & Sunding, 1993; Abbate et al., 2005) hanno rivelato 21 specie accettate comunemente, 7 delle quali sono state trovate nel Mediterraneo, 4 in Africa e 10 in Asia. Tuttavia, per molte di esse ci sono ancora discussioni circa la nomenclatura (vedi Capitolo 10).

Nella Figura 2 sono mostrate le specie di *Pancratium* presenti nel Mediterraneo e nelle zone adiacenti e i loro areali di distribuzione. Esse sono: *P. arabicum* Sickenb., presente dall'Egitto al Sinai; *P. canariense* Ker-Gawl., endemico delle Isole Canarie; *P. foetidum* Pomel, segnalato nel nord Africa; *P. hirtum* A. Chev. (= *P. tenuifolium* Hochst. ex A. Rich.) ritrovato nell'Africa tropicale; *P. illyricum* L., presente nell'Arcipelago Toscano, in Corsica ed in Sardegna; *P. linosae* (Lojac.) Soldano & F. Conti (= *P. angustifolium* Lojac), endemico dell'Isola di Linosa (Isole Pelagie); *P. maritimum* L., che si estende in tutto il bacino del Mediterraneo fino al Mar Nero e al Mar Caspio, incluso parte delle coste Atlantiche; *P. maximum* Forssk., segnalato a nord-est del Sudan ed a sud-est della Penisola Arabica; *P. sickenbergeri* Asch. & Sweinf. Ex Boiss., il cui areale si estende dall'Egitto fino a nord della Penisola Arabica; *P. tenuifolium*, presente nell'Africa tropicale ed in Africa meridionale; *P. tortuosum* Herb., segnalato dall'Egitto all'Eritrea e ad ovest della Penisola Arabica; *P. trianthum* Herb., distribuito nell'Africa occidentale e tropicale.

La maggior parte di tali specie prediligono pendii asciutti, mentre solo un piccolo numero di taxa si è adattato a crescere sulle dune costiere (*P. arabicum*, *P. linosae*, *P. maritimum*) o su suoli desertici (*P. tortuosum*, *P. sickenbergeri*). Oltre alle specie sopra elencate il genere include anche altre 11 specie indicate qui di seguito: per l'Africa, *P. centrale* (A. Chev.) Traub (presente dal nord-est del Cameroon ad ovest dell'Etiopia) e *P. parvicoronatum* Geerinck (segnalato dal sud del Zaire al Malawi); per l'Asia, *P. biflorum* Roxb. (ritrovato in India, Sri Lanka e Hong Kong), *P. donaldii* Blatt. (il cui areale si estende a ovest dell'India), *P. landesii* Traub (distribuito nel sud della Penisola

Arabica), *P. longiflorum* Roxb. Ex Ker Gawl. (il cui areale comprende l'India centrale e orientale), *P. parvum* Dalzell e *P. st.-mariae* Blatt. & Hallb. (presenti ad ovest dell'India), *P. triflorum* Roxb. (presente ad est dell'India), *P. verecundum* Aiton (distribuito dal Pakistan al Himalaya) e *P. zeylanicum* L. (segnalato nella fascia compresa tra l'India e la Malesia).

## Capitolo 4

### *Pancratium maritimum* L.

*Pancratium maritimum* è una pianta erbacea bulbosa ed è l'unica tra le specie del suo genere ad avere un areale di distribuzione molto ampio, che comprende tutte le coste sabbiose del Mediterraneo e parte delle coste Atlantiche, del Mar Nero e del Mar Caspio (Fig. 2).

La pianta adulta è alta 30-60 cm, con bulbo ovoidale di 5-6 cm e scapo afillato compresso portante all'apice un'infiorescenza umbelliforme con 5-10 fiori e una spatula basale membranacea bivalve di 4-7 cm, caduca. Le foglie (5-6) tutte basali di colore verde glauco sono spesso marcescenti durante la fioritura. Larghe 1-1,5 cm e lunghe 50-60 cm, presentano una lamina lineare e ritorta a spirale (Fig. 3 A). I fiori attinomorfi ed ermafroditi sono molto profumati. Presentano un perigonio gamotepalo con tubo imbutiforme verdastro di 5-8 cm, 6 tepali lanceolati bianchi e mucronati all'apice e con striatura verde mediana sul lato esterno. La paracorolla ampia e larga presenta 6 lobi biforcati che danno l'aspetto di 12 denti triangolari. Gli stami sono 6, sporgenti e inseriti tra i denti della paracorolla con filamenti saldati ad essa. Le antere sono gialle, lineari e dorsifisse. L'ovario infero è triloculare. Lo stilo lungamente sporgente è filiforme e a stimma capitato (Fig. 3 B).

Il frutto è una capsula obovoide loculicida che nel mese di agosto, raggiunta la maturità, dissecca e si apre dall'alto al basso, lungo le linee dorsali e ventrali dei carpelli, lasciando uscire i semi ivi contenuti (Fig. 3 C). Questi sono di notevoli dimensioni, di colore nero e possono avere forma molto variabile (Fig. 3 D). Essi germinano a basse temperature, in primavera e in autunno quando la percentuale di acqua piovana nella sabbia è maggiore (Keren & Evenari, 1974; Balestri & Cinelli, 2004) La germinazione è totalmente inibita dalla salinità e dallo stress idrico (Balestri & Cinelli, 2004). Una singola pianta può produrre 2-3 infiorescenze che, a loro volta, possono portare da quattro a cinque capsule, contenenti in totale una ventina di semi. La particolarità di tali semi è la

loro straordinaria capacità di galleggiamento che deve aver favorito la dispersione di questa specie lungo tutto il suo areale (Werker & Fahn, 1975). Essi, infatti, sono estremamente leggeri (circa 50 mg ognuno) e sono rivestiti da un parenchima aerifero nero e spugnoso (Arcangeli 1896). Ricerche condotte da Keren & Evenari (1974) hanno dimostrato che i semi galleggiano per un massimo di 50 giorni in acqua di mare non agitata e 19 giorni in acqua di mare in agitazione. Dopo il galleggiamento i semi non perdono di germinabilità se sciacquati in acqua dolce. La capacità di galleggiare però decresce con il tempo dato che il seme, alla fine, assorbe acqua e affonda. Quindi la disseminazione in questa specie è favorita dal vento e dalle correnti marine (Arcangeli 1896).

*Panocratium maritimum* ha un genoma molto grande di circa 30000 Mbp (Zonneveld et al., 2005) e l'assetto cromosomico è  $2n = 22$  (Carpaneto et al., 1983). Questa pianta è considerata allogama (Eisikowitch & Galil, 1971) ed ha uno spettro di impollinatori molto variabile costituito da diversi organismi come: il lepidottero *Sphinx convolvoli* L. nel sud della Francia (Thompson, 1914; Leraut, 1997) o la lucertola *Podarcis lilfordi*, nelle Isole Baleari (Perez-Mellado et al., 2000). Tuttavia alcuni studi suggeriscono l'ipotesi di una riproduzione vegetativa o autogama per le popolazioni geograficamente isolate (Sanaa & Fadhel, 2010).

Generalmente *P. maritimum* si presenta in piccoli gruppi di 5-6 individui (ciò è legato essenzialmente alla riproduzione vegetativa) nell'ammofileto e soprattutto nel crucianello; viene invece rinvenuto isolatamente nelle stazioni più prossime al mare, nell'agropireto e nel cakileto (Carpaneto et al., 1983). Le caratteristiche di questo ambiente (per esempio concentrazione bassa di sostanze nutrienti, alta salinità e bassa capacità di ritenere l'acqua) rendono difficile la crescita e lo sviluppo delle piante. Tuttavia la sopravvivenza di *P. maritimum* in ambienti tanto ostili è favorita dallo sviluppo di associazioni mutualistiche tra le radici della pianta e alcuni microorganismi quali batteri azoto fissatori e micorrize (Nikopoulos et al., 2006; Camprubi et al., 2012). In questo modo la pianta riceve nutrienti inorganici ed acqua dai microorganismi che ottengono in cambio una costante fornitura di carbonio ed energia.

*Panocratium maritimum* risulta essere anche un'importante fonte di principi attivi. Infatti, alcuni lavori hanno evidenziato che gli estratti del bulbo e delle foglie in questa specie hanno proprietà fungicide (Sur-Altiner et al., 1999), attività acaricida e insetticida (Abbassy et al., 1998) e proprietà farmacologiche (Berkov et al., 2004). *Panocratium maritimum*, infatti, contiene almeno 40 diversi alcaloidi, alcuni dei quali hanno interessanti proprietà farmacologiche, come: attività antitumorali (pancratistatine e unginorine; Pettit et al., 1995), antivirali (licorina), anti-colinesterasi (galantamine) e attività analgesiche (licorina e galantamine; Bastida & Viladomat, 2002).

Recentemente, Sanaa et al. (2013) ha evidenziato che *P. maritimum* presenta un'alta concentrazione di alginati (sali) che di regola si ritrovano essenzialmente nelle parete cellulare delle alghe brune come nel genere *Ascophyllum* Stackhouse (Fucaceae) e *Laminaria* J. V. Lamouroux (Laminariaceae). Gli alginati o loro derivati vengono usati come stabilizzanti ed addensanti nell'industria alimentare, cosmetica, e farmaceutica oltre che nel campo medico (costruzione di protesi dentarie).

Dal punto di vista ecologico, *P. maritimum* svolge anche un importante ruolo nella difesa dei litorali sabbiosi. Tale pianta, infatti, insieme ad altre geofite tipiche degli ambienti costieri, esercita un'azione di ostacolo al trasporto eolico, contribuendo a favorire l'accumulo di sedimenti sabbiosi e impedendo il loro avanzamento verso l'entroterra. Con i propri apparati radicali, inoltre, aiuta a consolidare il substrato, poiché trattiene la sabbia e ne permette l'ulteriore deposito. Queste azioni favoriscono la formazione di dune costiere che rappresentano una riserva naturale di sedimenti sabbiosi necessari per il ripascimento delle spiagge (Onori et al., 2009).

Purtroppo, la presenza di questa specie, una volta cospicua, attualmente si è sensibilmente ridotta a causa dell'intervento antropico. Un esempio importante è la scomparsa di popolazioni naturali di *P. maritimum* dall'Isola d'Ischia a causa dell'impatto umano sulle spiagge (Ricciardi et al., 2004). In Francia, le popolazioni di *P. maritimum* sono diminuite a causa dell'urbanizzazione dei litorali e per questo motivo la specie attualmente risulta protetta da un decreto regionale (Zahreddine et al.,



2004). In Spagna, la costante alterazione e distruzione del sistema dunale dovuto all'eccessivo traffico durante la stagione estiva ha inciso negativamente sulla presenza della specie rendendola scarsa (Zahreddine et al., 2004). A Creta, la specie è considerata in pericolo, e dal 1996 sono stati avviati programmi di conservazione della specie, limitando l'attività edilizia sulle dune sabbiose (Zahreddine et al., 2004). In Italia, la specie viene citata nella Legge Regionale n°61 del 19 settembre 1974 tra le piante di cui è vietata la raccolta, perché molto rare e in via di estinzione (Onori et al. 2009).

Ad oggi *P. maritimum* non è stato ancora inserito nelle liste IUCN e sono disponibili solo pochi studi di genetica di conservazione effettuati in Libano (Zahreddine et al., 2004); per il versante tirrenico dell'Italia settentrionale (Grassi et al., 2005); e per la Tunisia (Sanaa & Fadhel, 2010). Tutti questi studi confermano lo stato precario di questa pianta dal punto di vista conservazionistico.

## Capitolo 5

### Strumenti d'indagine: i marcatori molecolari

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico rilevabile tramite sonde o inneschi (*primer*) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico e inequivocabile il tratto cromosomico con cui si identifica. Tali strumenti d'indagine sono in grado di rilevare i polimorfismi nella sequenza nucleotidica del genoma di ogni individuo causati da fenomeni di inserzione, delezione, traslocazione, duplicazione, mutazioni puntiformi, ecc. Le caratteristiche che rendono i marcatori molecolari del DNA ottimi strumenti di analisi possono essere brevemente così riassunte:

- sono distribuiti in tutto il genoma, trascritto e non, quindi possono contraddistinguere anche regioni introniche e regioni di regolazione, permettendo di rilevare differenze tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili;
- in molti casi hanno espressione codominante, consentendo così di distinguere la condizione di eterozigosi da quella di omozigosi;
- presentano un alto grado di oggettività e di attendibilità, contrariamente ai caratteri morfologici i quali invece sono troppo spesso influenzabili da fattori ambientali esterni.

Nelle cellule vegetali si possono distinguere vari tipi di marcatori molecolari in base alla localizzazione della sequenza genica presa in esame. Infatti all'interno delle cellule vegetali il DNA è presente in tre compartimenti: il nucleo, il mitocondrio ed il plastidio. La scelta ha conseguenze analitiche importanti: il DNA nucleare ha eredità biparentale (cioè viene ereditato sia attraverso l'ovulo sia attraverso il polline), mentre il DNA dei due organelli è ereditato per via uniparentale, o attraverso l'ovulo o attraverso il polline.

## 5.1 Il DNA plastidiale

Il genoma plastidiale, cpDNA, è largamente utilizzato nelle analisi di diversità genetica e negli studi filogenetici in quanto è presente in un numero relativamente elevato di copie e generalmente risulta omogeneo all'interno di una specie. Il cpDNA si compone di un unico cromosoma circolare di DNA a doppio filamento compreso tra le 129 Kb e le 217 Kb (Downie et al., 1992) ed è costituito tipicamente da quattro regioni: un'ampia regione di geni a singola copia (*Large Single Copy*, LSC), una piccola regione di geni a copia unica (*Small Single Copy*, SSC) e due copie di regioni ripetute invertite che separano le regioni a copia unica (*Inverted Repeat*, IR) (Fig. 4).

Come accennato precedentemente, il DNA plastidiale è ereditato in maniera uniparentale, per linea materna, attraverso il seme nella maggior parte delle Angiosperme; nelle Gimnosperme invece è ereditato generalmente per linea paterna, attraverso il polline (Corriveau & Coleman, 1988; Birky, 1995). Tuttavia sono noti anche casi di eredità biparentale come in alcune specie appartenenti alla famiglia delle Passifloraceae (Hansen et al., 2007).

Il cpDNA presenta un tasso di mutazione di circa 3 volte superiore rispetto al DNA mitocondriale e pari alla metà del DNA nucleare (Wolfe et al., 1987); le sue mutazioni sono da imputare essenzialmente a sostituzioni nucleotidiche e riarrangiamenti quali inserzioni, delezioni e inversioni. Inoltre, a differenza del DNA mitocondriale, il genoma plastidiale è molto più stabile, poiché gli eventi di riarrangiamento avvengono con minore frequenza e tali da non compromettere il suo utilizzo per analizzare l'evoluzione di specie o generi affini (Judd et al., 1998).

### **5.1.1 Il gene *ndhF***

Il gene *ndhF* codifica per la subunità F del complesso NADH deidrogenasi ed è presente nella regione piccola a singola copia del genoma plastidiale.

La NADH deidrogenasi, nota anche come NADH-CoQ reduttasi, è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi e catalizza il trasferimento di elettroni e di protoni dal NADH all'ubichinone.

Questo marcatore esibisce un tasso di sostituzione nucleotidica relativamente alto e superiore di circa il doppio a quello registrato per il gene *rbcL* (Olmstead & Reeves, 1995). In origine il gene *ndhF* veniva utilizzato per determinare le relazioni filogenetiche esistenti a livello di famiglia (Olmstead & Sweere, 1994; Bohs & Olmstead, 1997). Quando successivamente sono state rese disponibili le sequenze di *ndhF* provenienti da più famiglie vegetali, è stato chiaro che questo marcatore potesse essere utilizzato per indagini filogenetiche anche a più bassi livelli tassonomici (inter e intrageneri) (Olmstead et al., 1998).

Tra le Amaryllidaceae per esempio Santos-Gally et al. (2011) ha utilizzato il gene *ndhF* per analizzare le relazioni filogenetiche e biogeografiche nel genere *Narcissus*, mentre Meerow et al. (2006) ha utilizzato tale marcatore per effettuare analisi cladistiche tra le Amaryllidaceae Euroasiatiche.

### **5.1.2 Il gene *rbcL***

Il gene *rbcL* codifica per la subunità maggiore dell'enzima fotosintetico ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO) che è il più importante accettore di carbonio in tutti gli eucarioti fotosintetici e nei cianobatteri. Questo gene è presente in tutti gli organismi vegetali (fanno eccezione solo gli organismi vegetali parassiti). E' stato il primo e sicuramente uno dei più utilizzati marcatori in studi filogenetici nell'ambito di generi e famiglie. A favorire ciò fu importante la messa a punto di *primer* universali necessari per amplificare, mediante PCR il gene *rbcL*, isolato da Gerard Zurawski, ricercatore dell'università della Georgia, U.S.A. (Zurawski, 1984). La disponibilità di tali *primer* ha incoraggiato molti sistematici vegetali ad amplificare e sequenziare le sequenze del *rbcL* e il risultato è stato che esistono ben più di 2000 sequenze depositate in

GenBank. Ciò ha permesso di ricostruire la filogenesi di numerose famiglie vegetali utilizzando l'enorme *dataset* presente in GenBank che risulta accessibile gratuitamente.

Attualmente questo gene è ancora molto utilizzato in studi di tassonomia e tale scelta può essere giustificata da varie ragioni: (1) presenta un basso tasso di evoluzione che permette di stimare le relazioni intrageneriche o di ordine superiori; (2) è possibile disegnare *primer* pseudouniversali in zone del gene conservate che corrispondono al sito attivo o regolatorio della subunità (Freshwater & Rueness, 1994).

Il gene *rbcL*, in associazione alla regione *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*F*<sup>(GAA)</sup> è stato utilizzato da Mellow et al. (1999) per effettuare un'analisi cladistica nelle Amaryllidaceae.

### **5.1.3 La regione *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*F*<sup>(GAA)</sup>**

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

L'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> è compreso tra due esoni che codificano il tRNA per la leucina del cpDNA. Tale introne viene definito di Gruppo I, ed è caratterizzato da una elevata struttura di base conservata che codifica l'*autosplicing* del pre-tRNA (Palmer, 1985). Nelle piante, l'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> di solito mostra sequenze conservate nelle regioni fiancheggianti entrambi gli esoni del *trnL*<sup>(UAA)</sup>, mentre la parte centrale è altamente variabile (Bakker et al., 2000).

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

La natura conservativa dei geni RNA *transfer* e l'apparente assenza di riarrangiamenti dei geni nella regione *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*F*<sup>(GAA)</sup> ha facilitato il disegno di *primer* universali (Taberlet et al., 1991). Per tale ragione l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> sono considerati due

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

Meerow *et al.* (1999) ha utilizzato l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intargenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> in associazione alle sequenze del *rbcL* per effettuare un'analisi cladistica nelle Amaryllidaceae.

## 5.2 Il DNA nucleare

Contrariamente al DNA plastidiale, il DNA nucleare delle piante è un genoma diploide che viene trasmesso seguendo una segregazione mendeliana ed è quindi soggetto a ricombinazione.

Le dimensioni dei genomi nucleari delle piante spaziano in tutto l'ambito dimensionale. Il genoma vegetale conosciuto più piccolo, di  $7 \times 10^7$  bp, appartiene ad *Arabidopsis thaliana*, mentre uno dei più grandi è un membro della famiglia delle *Liliaceae*, *Fritillaria assyriaca*, con  $1 \times 10^{11}$  bp. La grande variabilità nelle dimensioni dei genomi delle piante possono in qualche modo essere attribuite al DNA ripetitivo e a genomi duplicati (poliploidia). I genomi nucleari, infatti, oltre a contenere DNA a singola copia, possiedono anche DNA ripetitivo che consiste di gruppi o famiglie di sequenze ripetute simili, ma non necessariamente identiche. La sequenza e la lunghezza delle ripetizioni variano tra le famiglie ripetitive all'interno di una specie, la quale a sua volta può avere da 1000 fino a 40000 famiglie ripetitive.

In base alla sua organizzazione nel genoma, il DNA ripetitivo può essere suddiviso in due classi: ripetuti dispersi e i ripetuti seriali.

La classe dei ripetuti dispersi, composte da sequenze ripetitive che mostrano vari gradi di divergenza delle sequenze, comprende elementi trasponibili e retrotrasposoni, che sono sparsi lungo tutto il genoma.

Le sequenze ripetute seriali vengono indicate come DNA satellite e sono sequenze non codificanti associate a strutture caratteristiche dei cromosomi come i centromeri e i telomeri. Di questa classe fanno parte i microsatelliti.

### **5.2.1 I microsatelliti**

I microsatelliti, o SSR (*Simple Sequence Repeats*), sono sequenze ripetute di DNA non codificante costituite da unità di ripetizione molto corte (da 2 a 5 paia di basi) presenti molto frequentemente all'interno dei genomi di molti taxa (Wang et al., 2009).

La funzione di queste zone nel genoma è ancora oggi poco nota. In particolare per quel che riguarda le ripetizioni situate nelle regioni codificanti, si pensa che esse possano avere un ruolo nella regolazione della trascrizione dei geni ad esse adiacenti. Per quanto riguarda invece gli SSR situati al di fuori delle regioni codificanti è verosimile che siano spaziatori tra i geni, e quindi non soggetti a pressioni selettive (Wang et al., 2009).

La grande variabilità che si riscontra nelle sequenze microsatellitarie è dovuta al loro elevato tasso di mutazione. Tale variabilità sembra essere attribuibile ad un appaiamento errato tra i due filamenti complementari durante la replicazione o riparazione del DNA, dovuto ad uno slittamento nella replicazione (*replication slippage*) (Wang et al., 2009).

In breve, in fase di sintesi, può accadere che uno dei due filamenti scivoli sull'altro formando un "loop"; questa bolla, a seconda che si sia formata per uno scivolamento all'indietro o in avanti, contiene una o più ripetizioni del filamento di sintesi o del filamento parentale, causando rispettivamente un'inserzione o una delezione sul filamento in fase di sintesi (Wang et al., 2009).

Tale meccanismo genera dei polimorfismi di lunghezza che rendono i microsatelliti marcatori particolarmente informativi negli studi di genetica di popolazione (Wang et al., 2009).

La ricerca di tali polimorfismi avviene utilizzando la PCR con l'ausilio di *primer* specifici disegnati in modo da essere complementari alle regioni che fiancheggiano le sequenze ripetute e che risultano essere altamente conservate e specifiche del genere e della specie. I *primer* così disegnati

consentono di amplificare singoli microsatelliti, che possono differire tra individui, non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto (Wang et al., 2009).

Tuttavia, poichè la maggior parte dei microsatelliti è genere-specifica o specie-specifica, per essere utilizzati come marcatori del DNA è necessario isolare oligonucleotidi specifici per la specie analizzata.

### **5.2.2 Cenni sui protocolli di isolamento dei microsatelliti**

Fino ad oggi, sono state descritte diverse strategie che consentono di isolare loci microsatellitari o costruire librerie di SSR. L'approccio tipico di base prevede la digestione del DNA, l'ibridazione con sonde specifiche per le regioni ripetute, il clonaggio e il sequenziamento del DNA ibridato (Zane et al., 2002; Kalia et al., 2011). Negli ultimi anni si stanno sviluppando però nuove tecniche di sviluppo di librerie SSR che adoperano una nuova generazione di sequenziatori (NGS) o la tecnologia del pirosequenziamento (Zalapa et al., 2012). Tali tecnologie permettono un rapido sequenziamento dell'intero genoma, ma hanno dei costi ancora troppo alti (Zalapa et al., 2012). Una reale riduzione dei costi si è avuta recentemente con lo sviluppo di un nuovo tipo di sequenziamento che sfrutta la tecnologia Illumina (*Synthesis Bridge PCR*) (Illumina Inc.) (Zalapa et al., 2012). Nell'ultimo periodo però si sta sviluppando una tecnica che sembra essere ancora più competitiva ed è quella che sfrutta il sequenziamento *pH-change*, come la tecnologia Ion Proton (Life Technologies). Tale tecnologia è molto veloce, non utilizza sistemi ottici per leggere le basi di DNA e misura invece le variazioni di pH durante la reazione di sequenziamento.

Queste nuove tecnologie offrono a lungo termine un notevole risparmio economico, perché permettono di produrre molti loci SSR. Tuttavia se si ha bisogno di pochi loci SSR è più conveniente utilizzare le procedure standard che prevedono l'utilizzo dei sequenziatori di prima generazione (chimica di Sanger; Sanger et al. 1977), anche se la maggior parte di questi protocolli reperibili in letteratura non sono economicamente competitivi, e la loro bassa resa o la mancanza di ottimizzazione possono ridurre la loro efficacia (Squirrel et al., 2003).



# MATERIALI E METODI

# Capitolo 6

## Obiettivo I

### “Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere *Pancratium* L. presenti nel bacino del Mediterraneo”

#### 6.1 Campioni analizzati

In totale sono stati analizzati 33 campioni di Amaryllidaceae di cui 28 appartengono al genere *Pancratium*. Gli *outgroup* sono stati scelti sulla base dei risultati di alcuni lavori presenti in letteratura sulla filogenesi delle Amaryllidaceae (Meerow et al., 1999; Meerow & Snuman, 2006; Meerow et al., 2006). *Amaryllis belladonna* L., *Cyrtanthus herrei* (F.M. Leight.) R.A.Dyer, *Lycoris squamigera* Maxim., *Ungernia flava* Boiss. & Hausskn. ex Boiss, e *Worsleya rayneri* (Hook.f.) Traub & Moldenke sono stati selezionati come *outgroup*, e in dettaglio *A. belladonna* è stata adoperata per radicare l'analisi filogenetica. L'elenco dettagliato dei campioni esaminati è riportato nella Tabella 1.

#### 6.2 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata seguendo la procedura di Doyle e Doyle (1990) con piccole modifiche, quali: (1) utilizzo di circa 100 mg di materiale fogliare di partenza; (2) due passaggi in cloroformio-alcool-isoamilico (24:1); (3) risospensione del DNA in 100 µl di acqua distillata sterile.

Brevemente, si riportano le varie fasi:

- aggiunta al materiale frantumato di 900 µl di CTAB 2X e di 0,2% del volume di β-mercaptoetanolo. Il campione in seguito viene incubato per 30 minuti a 60°C;
- successivamente si effettua la fase di purificazione con due passaggi in cloroformio-alcool isoamilico (24:1). Ad ogni passaggio si preleva la fase acquosa dopo aver centrifugato il campione per 5 minuti a 6000 rpm (rotazioni per minuto);
- prelevata la fase acquosa si aggiunge ad essa una quantità di isopropanolo pari al 70% del volume prelevato. In seguito si incuba per 10 minuti a -20°C, per facilitare la precipitazione del DNA;
- utilizzando una centrifuga a freddo per 6 minuti a 12000 rpm, si allontana la fase acquosa dal DNA. Dopo il DNA sarà trattato con EtOH al 70% per eliminare i sali residui. Per eliminare l'EtOH si utilizza un concentratore a vuoto (Centrivap Cold Trap, Labconco);
- infine il DNA è risospeso in 50 µl di acqua bidistillata sterile.

Successivamente i campioni di DNA estratto sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8%, utilizzando come tampone il TEB 1X a cui viene aggiunto 1/100 del volume di EtBr (10 mg/ml). Per quantificare la concentrazione del DNA estratto è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare noto, il genoma del *fago*λ (AppliChem GmbH) digerito con l'enzima di digestione *HindIII* (AppliChem GmbH). Il voltaggio utilizzato è stato di 60 volt, in seguito il gel è stato osservato al transilluminatore.

### 6.3 Amplificazione e sequenziamento

I marcatori plastidiali analizzati in questo studio sono stati i geni *ndhF* e *rbcL*, lo spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> e l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup>.

Tali marcatori sono stati amplificati usando sia *primer* riportati in letteratura sia *primer* disegnati appositamente per questo studio (Tab. 2). Ogni reazione è stata allestita in un volume finale di 25

μl, contenente 5-10 ng di DNA, 12,5 μl di 2X DreamTaq™ PCR Master Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) e 0,125 μl di ciascun *primer* 50 μM. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Life Technologies) secondo il seguente protocollo: denaturazione iniziale per 3 minuti a 95°C, seguita da 35 cicli ognuno di 30 secondi a 95°C, 1 minuto alla temperatura di appaiamento specifica dei *primer* e 1 minuto a 72°C. Infine, sono stati aggiunti al programma 5 minuti di ulteriore estensione a 72°C.

I frammenti amplificati sono stati successivamente purificati usando il kit DNA Enzyme-free isolation Spin Kit (AppliChem GmbH) e sequenziati mediante una modifica del metodo di Sanger et al. (1977) utilizzando dideossinucleotidi fluorocromati (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1, Applied Biosystems, Life Technologies) attraverso un sequenziatore automatico (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies).

## 6.4 Analisi dei dati

Le sequenze complete di entrambi i filamenti di ogni prodotto di PCR sono state editate, allineate, e controllate utilizzando i programmi AB DNA Sequencing Analysis ver. 5.2 (AppliedBiosystems), Sequence Navigator ver. 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer) e BioEdit ver. 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Le sequenze ottenute sono state allineate separatamente utilizzando il programma Clustal W ver. 1.4 (Thompson et al., 1994), impiegato come sottoprocesso del programma BioEdit ver. 7.0.9 e successivamente è stato generato un allineamento combinato per tutti i marcatori utilizzati.

Le analisi filogenetiche sono state svolte utilizzando tre approcci: massima parsimonia (MP, Farris et al., 1970), massima probabilità (ML, Felsenstein, 1981) ed inferenza Bayesiana (BI, Mau et al., 1999). I tre alberi sono stati confrontati per trovare le aree a maggior risoluzione nei dati. Per evitare sovrastime, le *indel* sono state considerate come dati mancanti e non come quinto stato.

L'analisi MP è stata effettuata utilizzando il programma PAUP\* ver. 4.0b10 (Swofford, 1998).

Una ricerca euristica è stata condotta utilizzando 2000 cicli di addizioni casuali di sequenze, salvando 20 alberi per volta con lunghezza minima e utilizzando l'algoritmo TBR. I valori di *bootstrap* (Felsenstein, 1985) sono stati calcolati da 1000 replicati utilizzando la strategia di ricerca euristica, la semplice addizione delle sequenze dei taxa e l'algoritmo TBR.

L'analisi ML è stata eseguita con PAUP\* (Swofford, 1998) effettuando una ricerca euristica con 250 addizioni casuali, utilizzando l'algoritmo TBR. Il modello scelto di evoluzione molecolare è stato testato usando l'*Akaike information criterion* (AIC) (Akaike, 1974), corretto per piccoli campioni (AICc). Sono stati calcolati i valori AICc, ed è stato selezionato il modello ottimale utilizzando il programma jModeltest ver. 0.1.1 (Posada, 2008). Il supporto per i gruppi è stato valutato con 500 replicati di *bootstrap* (Felsenstein, 1985) utilizzando una ricerca euristica con 10 *random entries*. I valori dei parametri ottenuti dalla ricerca iniziale ML sono stati usati per l'analisi *bootstrap*. A causa della memoria limitata, il numero di alberi salvato in ogni replicato di *bootstrap* è stato limitato a 500.

L'approccio BI per la ricostruzione filogenetica è stato implementato utilizzando il programma MrBayes ver. 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). È stato utilizzato l'algoritmo Bayesiano *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) per 15000000 generazioni con una catena fredda e tre catene calde, partendo da alberi casuali e alberi selezionati ogni 100 generazioni. I risultati sono riportati come probabilità posteriori (PP) (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

Utilizzando successivamente il programma RASP ver. 1.107 (Yu et al., 2011) è stata svolta un'analisi di dispersione-vicarianza per capire la distribuzione ancestrale e gli eventi passati coinvolti nella storia biogeografica di *Pancratium*. Il metodo S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis) implementato in RASP è descritto in Nylander et al. (2008) e Yu et al. (2010). In S-DIVA, le distribuzioni ancestrali su una data filogenesi vengono dedotte assegnando costi differenti per gli eventi biogeografici: vicarianza e duplicazione si assume a priori che abbiano un costo uguale a zero, mentre la dispersione e le estinzioni assumono un costo uguale a 1. Le

ricostruzioni migliori sono quelle che minimizzano gli eventi di dispersione ed estinzione secondo un criterio di parsimonia (Ronquist, 1997). Poiché S-DIVA richiede un albero senza politomie, è stato usato un albero completamente risolto. Per le analisi sono state codificate 20 aree geografiche: A = Isole Canarie; B = nord Africa; C = Africa tropicale; D = Corsica, Sardegna; E = area compresa tra la Penisola Balcanica e la Turchia, Francia, Italia, Portogallo, Spagna; F = Medio Oriente (dalla Siria al nord della Penisola Arabica); G = sud Africa; H = Asia meridionale (India, Sri Lanka); I = Asia orientale (Cina, Giappone, Korea); J = Asia centrale (Turkmenistan, Uzbekistan, Tajikistan, Kirghizistan e Kazakistan); K = Sud America. Per comodità, le Penisole Iberica e Italiana, l'area dell'Egeo e l'Anatolia sono state racchiuse in un unico codice (F) che corrisponde ad una porzione dell'areale di *P. maritimum*.

Le Isole Canarie non sono state prese in considerazione per la determinazione delle aree di distribuzione di *P. maritimum*, poiché da lavori presenti in letteratura, è risultato che questa specie è stata introdotta recentemente (Baltisberger & Widmer, 2006). Inoltre, l'arcipelago toscano (Capraia e l'Isola d'Elba) non è stato incluso nell'areale di *P. illyricum* poiché la sua presenza nelle isole è probabilmente la conseguenza di eventi di dispersione recenti (Fossi Innamorati, 1991; Foggi et al., 2001).

Ronquist (1996, 1997) raccomandava una restrizione del numero delle aree dedotte ai nodi interni utilizzando l'opzione "*maxareas*". Dopo una considerazione preliminare, il massimo numero di possibili aree ad ogni nodo è stato impostato a 4 ("*maxareas*" = 4) poiché (1) ogni specie è presente in non più di 4 aree, (2) le due specie, con una distribuzione più estesa (*P. maritimum*, *P. tortuosum*) sono comuni in tre o quattro aree. Inoltre, in accordo con Meerow et al. (2006) e Sanmartín (2003), la ricostruzione delle aree ancestrali è stata eseguita con un limite sul massimo delle aree per ridurre le ambiguità a livello dei nodi basali. L'albero finale è stato ottimizzato con il *range* ancestrale.

---

# Capitolo 7

## Obiettivo II

### “Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in *Pancratium maritimum* L.”

#### 7.1 Campionamento delle popolazioni

Grazie all’aiuto di colleghi botanici sono stati reperiti in totale 417 individui di *P. maritimum* provenienti da 24 popolazioni geograficamente distribuite in tutto l’areale di distribuzione della specie (Fig. 5). L’elenco dettagliato delle popolazioni con le rispettive coordinate geografiche della zona di campionamento sono riportate in Tabella 3. Su ogni individuo campionato è stata effettuata l’estrazione del DNA genomico come descritto nel paragrafo 6.2.

#### 7.2 Isolamento dei loci microsatellitari

##### 7.2.1 Costruzione e arricchimento della libreria genomica

La libreria genomica è stata costruita con un metodo che si ispira sia ai classici protocolli di arricchimento (per esempio, Kandpal et al., 1994; Edwards et al., 1996; Hamilton et al., 1999; Glenn & Schable, 2005; Techen et al., 2010) sia ai protocolli di arricchimento di nuova generazione, come il metodo FIASCO che utilizza alcuni elementi della tecnica AFLP (*Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats*) (Zane et al., 2002).

Di seguito sono elencate le fasi principali previste dal protocollo. Per maggiori dettagli si rimanda al protocollo completo presente nell’Appendice 1.

**Fase 1: Preparazione del DNA** - La libreria genomica è stata costruita a partire da 2 µg di DNA genomico non degradato di un singolo individuo di *P. maritimum*. Tale DNA è stato sottoposto ad

un passaggio di un'ora a 37°C con RNasiA (AppliChem GmbH) per eliminare l'RNA.

**Fase 2: Digestione con gli enzimi di restrizione** - Il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *MseI* (Invitrogen, Life Technologies) così come previsto in una normale procedura AFLP (Vos et al., 1995).

**Fase 3: Elettroforesi ed estrazione da gel** - Il prodotto di digestione dopo essere stato precipitato è stato caricato su un gel d'agarosio all'1% insieme ad un ladder 100 bp (Promega) per permettere la separazione dei frammenti di DNA. Dopo l'elettroforesi il prodotto della digestione con dimensioni comprese tra 250 e 500 bp è stato isolato dal gel e purificato utilizzando un metodo economico che non prevede l'utilizzo di agarosio a bassa temperatura di fusione "low melting" (vedi Appendice 2).

**Fase 4: Preparazione degli adattatori e ligasi** - Gli adattatori *EcoRI* (5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3') e *MseI* (5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') (Macrogen Inc.) sono stati preparati in un termociclatore utilizzando un programma *touchdown*. Dopodiché i frammenti di 250-500 bp ottenuti alla fase precedente sono stati ligati agli adattatori secondo il protocollo standard previsto dalla ligasi T4 (Invitrogen, Life Technologies).

**Fase 5: Primo arricchimento** - Il prodotto della reazione di ligasi è stato amplificato utilizzando *primer* specifici per l'adattatore AFLP (Vos et al., 1995) ma che mancano della base terminale selettiva (*EcoI*-0: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'; *MseI*-0: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'; Macrogen Inc.).

**Fase 6: Preparazione della sonda biotinilata e ibridazione** - Circa 250 ng di prodotti ottenuti dal primo arricchimento sono stati ibridati a 500 ng di una sonda biotinilata in 3' e costituita dal *repeat* (GA)<sub>12</sub>.

**Fase 7: Preparazione della matrice Vetrex<sup>®</sup> Avidin D e cattura** - I frammenti di DNA legati alla sonda sono stati catturati utilizzando la matrice Vetrex<sup>®</sup> Avidin D (Vector Laboratories Inc.) che ha la capacità di legare oligonucleotidi biotinilati. I frammenti catturati sono stati infine eluiti dalla matrice.



**Fase 8: Secondo arricchimento e clonaggio** - I frammenti eluiti dalla matrice Vetrex<sup>®</sup> Avidin D sono stati amplificati tramite PCR utilizzando i *primer* già utilizzati nel primo arricchimento. Successivamente il prodotto dell'amplificazione è stato clonato seguendo il protocollo incluso nel kit di clonaggio PMosBlue blunt-ended cloning kit (GE Healthcare Europe GmbH).

**Fase 9: Screening delle colonie e sequenziamento** - I cloni contenenti l'inserto di interesse sono stati individuati attraverso PCR diretta delle colonie utilizzando i *primer* specifici per il vettore di clonaggio. I prodotti di PCR corrispondenti ai cloni ricombinanti infine sono stati direttamente sequenziati mediante una modifica del metodo di Sanger et al. (1977) utilizzando dideossinucleotidi fluorocromati (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1, Applied Biosystems) attraverso un sequenziatore automatico (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state editate e controllate utilizzando i programmi AB DNA Sequencing Analysis ver. 5.2 (Applied Biosystems), Sequence Navigator ver. 1.0.1 (ABI Prism, Perkin Elmer) e BioEdit ver. 7.0.9.0 (Hall, 1999).

### **7.2.2 Disegno dei *primer* e amplificazione**

Sono state selezionate le sequenze che contenevano i tratti ripetuti e sono state disegnate le coppie di *primer* fiancheggianti i microsatelliti utilizzando il software NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Le coppie di *primer* disegnate sono state testate amplificando tre popolazioni di *P. maritimum* distanti geograficamente: Israele (K), Italia (I) e Spagna (R) (Tab. 3, Fig. 5). Le amplificazioni sono state effettuate utilizzando il metodo M13-tailed PCR (Schuelke 2000) con alcune modifiche. Tale sistema prevede l'utilizzo di tre *primer* contemporaneamente: due *primer* locus-specifici (senso e antisenso) e un *primer* universale complementare ad un frammento costante (M13 tag) marcato con un fluorocromo. Al fine di ridurre il numero di analisi, rendendo possibile la lettura di più campioni contemporaneamente, sono stati utilizzati quattro diversi fluorocromi: 6-Fam, Ned, Vic o Pet (Applied Biosystems, Life

Technologies). Il frammento costante M13 tag (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') è stato aggiunto all'estremità 5' di ogni *primer* senso.

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Life Technologies) con il seguente protocollo: denaturazione iniziale per 5 minuti a 95°C, seguita da 30 cicli ognuno di 30 secondi a 95°C, 45 secondi alla temperatura di appaiamento specifica dei *primer* (vedi Tabella 4 per i dettagli) e 45 secondi a 72°C. A seguire sono stati aggiunti altri 8 cicli ognuno di 30 secondi a 95°C, 45 secondi a 53°C, e 45 secondi a 72°C. Infine, sono stati aggiunti al programma 10 minuti di ulteriore estensione a 72°C. Solo per una coppia di *primer* (vedi Tabella 4), invece, è stato necessario utilizzare un programma *touchdown* che ha previsto i seguenti passaggi: 5 min a 95°C, 8 cicli di 30 secondi a 95°C, 45 secondi da 58°C a 51°C con una riduzione di 1°C in ogni ciclo, e 45 secondi a 72°C; seguiti da 30 cicli simili utilizzando 50°C di appaiamento ed infine 10 minuti a 72°C di estensione finale.

Le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 10 µl di soluzione contenente: 4 ng di DNA, 1 X *Taq* buffer B (Solis BioDyne), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM di dNTP mix, 0,4 pmol del *primer* senso, 1,6 pmol del *primer* antisenso, 1,6 pmol del *primer* M13 marcato con i differenti fluorocromi (6-Fam, Ned, Vic o Pet; Applied Biosystems, Life Technologies) e 1 U di FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne).

I prodotti di amplificazione sono stati miscelati con lo standard *LIZ-500* (Applied Biosystems, Life Technologies) prima di essere caricati su un sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies) e le lunghezze degli alleli sono state identificate per mezzo del programma Peak Scanner™ ver. 1.0 (Applied Biosystems, Life Technologies).

### **7.2.3 Analisi del polimorfismo dei loci isolati**

I profili SSR relativi ai marcatori microsatellitari ottenuti dall'analisi delle tre popolazioni di *P. maritimum* sono stati sottoposti ad analisi statistiche per la stima dei parametri di genetica di

popolazione. Tali dati sono stati codificati in matrici di analisi (*file di input*) per i programmi di elaborazione utilizzati.

Per ogni popolazione e locus SSR, con il programma Cervus ver. 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007) sono stati calcolati i principali parametri genetici: il numero di alleli effettivi per locus ( $A$ ), l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) e l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ). Inoltre, con lo stesso programma è stato anche calcolato il contenuto di informazione polimorfica (PIC) per ogni marcatore. Il PIC è un indice che indica quanto un marcatore è polimorfico e dipende dal numero di alleli e dalla distribuzione della loro frequenza. Infine il programma Genepop ver. 4.1.3 (Rousset, 2008) è stato utilizzato per saggiare se le popolazioni naturali seguono o meno l'equilibrio di Hardy-Weinberg. La significatività delle deviazioni dall'equilibrio è stata analizzata per ogni locus in ogni popolazione utilizzando un “*exact test*” basato sul metodo delle catene di Markov (Guo & Thompson, 1992) usando 10000 permutazioni e 500 *batch* per permutazione. La soglia di significatività è stata fissata a  $p = 0,05$ . Una popolazione si discosta in modo significativo dall'equilibrio di Hardy-Weinberg quando il corrispondente valore di  $p$  è uguale o minore alla soglia fissata. Data la presenza di test multipli è stata applicata la correzione di Bonferroni abbassando la soglia di significatività a  $p = 0,01$ .

### **7.3 Screening iniziale delle popolazioni di tutto l'areale attraverso i marcatori selezionati**

Dei 21 marcatori isolati, sono stati scelti, per uno *screening* iniziale, i quattro che presentavano i valori più alti di polimorfismo (SSR15, SSR25, SSR27 e SSR31). Tali marcatori sono stati utilizzati per amplificare tutti i DNA di tutte le popolazioni di *P. maritimum* campionate.

I dati ottenuti dall'analisi elettroforetica degli amplificati sono stati utilizzati per calcolare le stime di variabilità genetica, le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e la variabilità genetica all'interno delle popolazioni e tra le popolazioni. Per le elaborazioni sono stati utilizzati oltre ai programmi Cervus e Genepop, anche Genetix ver. 4.05.2 (Belkhir et al. 2004) e GeneA1Ex ver. 6

(Peakall & Smouse, 2006).

### **7.3.1 Stime di diversità genetica**

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di variabilità genetica:

- 1) l'eterozigosi attesa ( $H_e$ ) in una popolazione, dove avvengono accoppiamenti casuali, è stata calcolata attraverso il programma Genetix;
- 2) i valori di PIC sono stati calcolati con il programma Cervus;
- 3) la proporzione di loci polimorfici (P) è data da  $P = \text{N loci polimorfici} / \text{N totale di loci}$ . Un locus è stato considerato polimorfico se la frequenza dell'allele più comune è minore di 0,95;
- 4) il numero medio di alleli per locus (A), è dato da  $A = \text{N totale di alleli} / \text{N totale di loci}$ .

### **7.3.2 Equilibrio di Hardy-Weinberg**

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg dovute ad un eccesso o deficit di eterozigoti è stato usato il programma Genepop. La significatività è stata testata tramite catene di Markov, usando 1000 permutazioni e 1000 *batch* per permutazione. La soglia di significatività è stata fissata a  $p = 0,01$ .

### **7.3.3 Statistiche F di Wright**

Gli F-statistici rappresentano un set di strumenti individuati da Wright (1951, 1965) per ripartire il deficit di eterozigosi all'interno degli individui appartenenti alla stessa popolazione e tra individui appartenenti a diverse popolazioni. Essi sono i parametri: *F<sub>is</sub>*, *F<sub>st</sub>* e *F<sub>it</sub>*.

Il parametro *F<sub>is</sub>* (o coefficiente di *inbreeding*) misura il deficit di eterozigosi all'interno di ogni popolazione. Esso può variare da -1 a +1: valori negativi indicano eccessi di eterozigoti (*outbreeding*), valori positivi eccessi di omozigoti (*inbreeding*). L'indice *F<sub>st</sub>* misura il deficit di eterozigosi tra le popolazioni dovuto alla deriva genica casuale ed è in grado di fornire una stima della distanza genetica fra popolazioni. Il parametro *F<sub>st</sub>* varia da 0 (assenza di differenziamento tra

le popolazioni) e 1 (differenziamento massimo). Questo indice fornisce inoltre una stima indiretta del flusso genico fra popolazioni.

Infine la statistica *Fit*, usata raramente, misura il deficit globale di eterozigosi. Questo indice non è generalmente informativo quanto lo sono *Fis* e *Fst* perché non distingue gli effetti dell'inincrocio da quelli della deriva genica.

Nel calcolo dei parametri *Fis*, *Fst* e *Fit* è stato utilizzato il metodo descritto da Wier & Cockerham (1984) che prende in considerazione la dimensione e il numero dei campioni attraverso il programma Genetix. I valori delle statistiche F riportati sono stati ottenuti con la procedura del Jackknifing. Essa è una procedura numerica che consiste nell'omettere, a turno, ciascuna unità (campioni o loci) e quindi ricalcolare da questo set di dati ridotti diversi F-statistici. La stima fornita dallo Jackknifing è la media aritmetica di tali valori ricalcolati.

#### **7.3.4 AMOVA**

Analisi Molecolare della Varianza (Excoffier et al., 1992) è una tecnica statistica che permette di analizzare le differenze tra i valori medi di una variabile continua in gruppi diversi e precisamente verifica quanta della varianza totale delle frequenze alleliche calcolate è spiegata dalle differenze tra gruppi di popolazioni e quanta dalle differenze tra individui entro i gruppi. Tale analisi è stata calcolata utilizzando il programma GeneAEx.

# RISULTATI

## Capitolo 8

### Obiettivo I

**“Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere *Pancratium* L. presenti nel bacino del Mediterraneo”**

#### **8.1 Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere *Pancratium* L. usando i marcatori plastidiali**

Nell'allineamento totale dei marcatori plastidiali analizzati si sono osservate nove delezioni: una per il gene *ndhF*, quattro per lo spaziatore *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup>, e quattro per l'introne del *trnL*<sup>(UAA)</sup>. Le percentuali di variabilità osservate per i singoli marcatori sono state: 2,64% per l'*ndhF* (51 nucleotidi variabili e 33 caratteri informativi); 0,85% per il gene *rbcL* (9 nucleotidi variabili e 5 caratteri informativi); 1,84% per lo spaziatore *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> (7 nucleotidi variabili e tre caratteri informativi); 1,8% per l'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> (9 nucleotidi variabili di cui 6 caratteri informativi).

Tra le entità esaminate alcune hanno presentato il 100% di identità di sequenza per tutti i marcatori considerati. Tali valori di identità di sequenza si sono osservati tra i due individui di *P. illyricum*, tra undici campioni di *P. maritimum* e tra i due *P. trianthum*. Inoltre, *P. hirtum* ha mostrato il 100% di identità con tutte le entità di *P. trianthum*, mentre *P. arabicum* ha presentato la stessa percentuale di identità con *P. linosae* e con tutti i campioni di *P. maritimum* analizzati.

Molto interessanti sono anche gli alti valori di variabilità di sequenza riscontrati tra i due

individui di *P. canariense* (*trnF* = uno SNP; *trnL* = cinque SNP più un'inserzione di 2 bp) e tra le due varietà di *P. foetidum* (*ndhF* = otto SNP; *rbcL* = uno SNP; *trnL* = un'inserzione di 6 bp).

Dall'analisi MP delle matrici combinate, si è ottenuto un albero di consenso di 265 passi evolutivi (caratteri variabili = 155, caratteri parsimoniosi informativi = 79, Indice di Consistenza = 0,932 ed Indice di Ritenzione = 0,941). E' stata effettuata inoltre un'analisi dei *bootstrap* che ha evidenziato alti valori per tutti i rami (Fig. 6).

Nell'albero MP è possibile osservare che all'interno del genere *Pancratium*, la specie in posizione basale è *P. illyricum*, in relazione di *sister group* con le rimanenti specie. Successivamente alla separazione di *P. illyricum*, è visibile una politomia irrisolta fra tre cladi principali: il primo clado include *P. zeylanicum*, *P. maximum* e *P. tenuifolium*; il secondo contiene gli individui di *P. canariense*, in relazione di *sister group* con il gruppo costituito da *P. tortuosum*, *P. hirtum* e *P. trianthum*; il terzo clado è formato da una sequenza ladderizzata di *P. foetidum* var. *tunetanum* Batt., *P. foetidum* var. *oranense* Batt., *P. sickenbergeri* dall'Arabia Saudita, e successivamente una politomia irrisolta che vede coinvolti *P. arabicum*, *P. linosae*, *P. sickenbergeri* da Israele e tutti gli individui di *P. maritimum* considerati.

In parallelo all'analisi MP è stata eseguita anche un'analisi ML che ha prodotto un albero con la medesima topologia e simili supporti di *bootstrap* (Fig. 6).

Per le analisi ML è stato usato il modello di evoluzione molecolare stimato con il programma jModeltest ver. 0.1.1. Il modello migliore è stato il trasversionale (TVM) con un tasso di variazione *gamma-distributed* (Rodriguez et al., 1990), con i seguenti parametri: frequenza della base A = 0,2955, C = 0,1686, G = 0,1874, e T = 0,3485; tasso di sostituzione A>C = 1,5701, A>G = 2,7526, A>T = 0,4699, C>G = 0,5717, C>T = 2,7526, e G>T = 1; *gamma distribution shape* = 0.1620; e proporzione di siti invariabili = 70.

Le analisi ML hanno mostrato la stessa topologia di cladi e simile supporto di *bootstrap* ottenuto con MP (Fig. 6).



Proseguendo con le analisi è risultato che anche la topologia dell'albero ottenuto dall'inferenza Bayesiana (Fig. 7) è molto simile a quella risultante dalle precedenti due analisi. Tuttavia, in quest'albero la politomia presente negli alberi MP e ML, anche se con un PP molto basso (0,34), è stata risolta a favore di due raggruppamenti di cui uno è costituito da *P. zeylanicum*, *P. maximum* e *P. tenuifolium* e un altro comprende *P. canariense*, *P. tortuosum*, *P. hirtum* e *P. trianthum*.

Infine è stata eseguita un'analisi di dispersione-vicarianza tramite il programma RASP. Per tali analisi è stato utilizzato l'albero senza politomie ottenuto dall'inferenza Bayesiana. Le ricostruzioni delle aree geografiche ottenute dal programma RASP sono sintetizzate in Figura 7.

È stato osservato che l'ancestore comune alle specie di *Pancratium* analizzate sembra possa provenire da tre possibili aree geografiche: dall'Africa tropicale e dal blocco Sardo-Corso (CD: 78%), dal nord Africa, dall' Africa tropicale e dal blocco Sardo-Corso (BCD: 11%), dal nord Africa e dal blocco Sardo-Corso (BD: 11%).

Dopo la separazione di *P. illyricum* probabilmente si è verificato un evento di vicarianza (B/C) che ha separato l'ancestore di *P. arabicum*, *P. foetidum*, *P. sikenbergeri*, *P. linosae*, *P. maritimum* presente in Africa settentrionale (B) e l'ancestore del resto dei taxa di *Pancratium* (*P. canariense*, *P. hirtum*, *P. maximum*, *P. tenuifolium*, *P. tortuosum*, *P. trianthum*, *P. zeylanicum*) presente nell'Africa tropicale (C).

Successivamente a questi eventi, tra i taxa di *Pancratium* si sono avuti interessanti fenomeni di dispersione e vicarianza come mostrato in Figura 7. Per esempio, per *P. maritimum* potrebbero essersi verificati degli eventi di dispersione dall'Africa settentrionale; mentre, *P. canariense* potrebbe essersi originato prima da fenomeni di dispersione dall'Africa tropicale (C) e successivamente da eventi di vicarianza.

---

## Capitolo 9

### Obiettivo II

#### “Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in *Pancratium maritimum* L.”

### 9.1 Isolamento dei loci microsatellitari

#### 9.1.1 Costruzione e arricchimento della libreria genomica

Dalla libreria genomica parziale arricchita per il *repeat* GA, sono state selezionate e sequenziate 130 colonie che si presumeva contenessero il microsatellite. Il numero di sequenze contenenti il *repeat* sono risultate essere 49 e di queste 38 hanno mostrato regioni fiancheggianti adatte (in qualità e lunghezza) al disegno dei *primer*.

Le 38 coppie di *primer* sono state testate su 48 individui di *P. maritimum* appartenenti a tre popolazioni distinte provenienti da Italia, Israele e Spagna (I, K, R) (Fig. 5; Tab. 3). Delle 38 coppie di *primer* disegnate, 16 hanno permesso di ottenere un prodotto di amplificazione in tutti gli individui testati, una sola coppia ha funzionato in maniera ottimale solo nelle popolazioni R e K, mentre 4 coppie sono state amplificate solo nella popolazione R.

Le restanti 17 coppie di *primer* hanno presentato notevoli problemi di amplificazione, infatti non è stato possibile ottimizzare le condizioni di PCR e per questo motivo si è deciso di scartarle.

Nella Tabella 4, per ciascuno dei loci polimorfici isolati, vengono riportate le sequenze dei *primer* disegnati, il fluorocromo utilizzato per marcare il *primer* M13, il tipo di *repeat*, gli intervalli delle dimensioni degli alleli riscontrati negli individui testati, il numero di alleli e la temperatura di appaiamento utilizzata per l'amplificazione.

### **9.1.2 Analisi degli indici di variabilità genetica nei loci isolati**

La variabilità dei 21 marcatori microsatellitari isolati è stata saggiata valutando: il numero di alleli ( $A$ ), l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) e osservata ( $H_o$ ), e i valori di PIC. Dopo uno *screening* iniziale è risultato che 16 loci sono polimorfici e 5 sono monomorfici (Tab. 4). In totale sono stati rintracciati 93 alleli, e per ogni locus si è avuto un numero di alleli che va da 1 a 11 con una media di 4,4 alleli. Per ogni locus si sono avuti valori di  $H_o$  compresi tra 0,00 e 1,00 e di  $H_e$  compresi tra 0,00 e 0,83 (Tab. 5). Mentre i valori di PIC per ogni marcatore sono compresi tra 0,00 e 0,75 (Tab. 4). Inoltre dai dati ottenuti si evince che 11 dei loci testati deviano dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ( $P < 0,01$ , Tab. 5).

## **9.2 Screening delle popolazioni attraverso i microsatelliti**

Dei 21 marcatori isolati, sono stati scelti, per uno *screening* iniziale, i quattro che presentavano i valori più alti di polimorfismo (SSR15, SSR25, SSR27 e SSR31). Tali marcatori sono stati utilizzati per analizzare la variabilità e la diversità genetica esistente nei 417 individui di *P. maritimum* provenienti da 24 diversi siti di campionamento indicati in Tabella 3 (Fig 5).

### **9.2.1 Stime di diversità genetica**

I 4 loci utilizzati per le analisi sono risultati tutti polimorfici. In totale sono stati identificati 70 alleli con un numero medio di alleli per locus pari a 17,5. Nella Tabella 6, per ciascuno dei marcatori, vengono riportati il numero di alleli, la frequenza dell'allele più rappresentato nel campione totale (insieme di popolazioni) e i valori del PIC. Il numero di alleli varia da 11 per il locus SSR31 a 25 per il locus SSR25.

Il locus SSR25 è il più polimorfico come evidenziato dal basso valore di frequenza media dell'allele più rappresentato. Al contrario il locus SSR15 mostra un valore di frequenza media dell'allele più rappresentato più alto ed è quindi il locus meno polimorfico tra i 4 analizzati.

Il valore di PIC è stato calcolato per ciascun marcatore e varia da 0,61 (SSR15) a 0,82 (SSR25) ed è sempre maggiore di 0,50. Secondo Botstein et al. (1980) loci con valori di PIC maggiori di 0,5 sono molto informativi. L'alto valore del PIC medio osservato, pari a 0,68, per i 4 microsatelliti, indica l'idoneità del set di marcatori utilizzati per l'analisi della diversità genetica nelle popolazioni di *P. maritimum*.

I valori di eterozigosità osservata e attesa per ciascuna popolazione sono riportati in Tabella 7. Si nota che i valori di eterozigosità osservata sono compresi tra 0,25 per la popolazione KA a 0,88 per AT, mentre i valori di eterozigosità attesa variano tra 0,30 per la popolazione A e 0,67 per TM. I valori medi dell'eterozigosità attesa e osservata si equivalgono essendo rispettivamente uguali a 0,47 e 0,48.

### **9.2.2 Equilibrio di Hardy-Weinberg**

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di HW ossia l'eventuale presenza di un eccesso o deficit di eterozigoti è stato utilizzato come parametro l'indice *Fis*. L'ipotesi  $H_0$  in questo caso è la presenza di equilibrio e può essere scartata se  $P$  è bassa ( $<0,01$ ). Nel nostro studio si sono osservate deviazioni significative dall'equilibrio ( $P < 0,01$ ), per tutti i loci in una o più popolazioni. In Tabella 8 sono mostrati i loci che risultano essere in disequilibrio in ciascuna popolazione. In particolare SSR25 è il locus che si trova più spesso in disequilibrio, mentre AT, F, T e CS sono le popolazioni con tutti i loci in disequilibrio.

### **9.2.3 Statistiche F di Wright**

La componente della variabilità genetica entro le popolazioni e tra le popolazioni è stata calcolata con il programma Genetix.

I valori del coefficiente di *inbreeding* (*Fis*) per ogni popolazione sono indicati in Tabella 7. Tali valori variano da 0,58 per la popolazione KA a -0,60 per la popolazione AT, con una media di 0,04.

Il livello di consanguineità rilevato nella popolazione AT è probabilmente dovuto alle dimensioni ridotte della popolazione costituita solo da 5 individui.

La misura della differenziazione delle popolazioni, come proporzione della diversità totale, è stata calcolata attraverso il coefficiente  $F_{st}$  di Weir & Cockerham. Generalmente, valori di  $F_{st}$  compresi tra 0,05 e 0,15 indicano una differenziazione genetica moderata tra le popolazioni (Hartl, 1988). Il valore rilevato di  $F_{st}$  tra le popolazioni analizzate è stato di 0,26 e indica un significativo differenziamento genetico tra le popolazioni analizzate.

#### **9.2.4 AMOVA**

I risultati ottenuti dall'AMOVA (Figura 8) indicano che la maggior parte della variazione genetica è da ascrivere in massima parte alle differenze tra individui entro le popolazioni (74%) e una percentuale più bassa e da imputare invece al differenziamento tra le popolazioni (26%).

## **DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

## Capitolo 10

### Obiettivo I

#### “Indagine filogenetica e biogeografica delle specie appartenenti al genere

#### *Pancratium* L. presenti nel bacino del Mediterraneo”

Alla luce dei risultati ottenuti in questo lavoro, è possibile affermare che, le relazioni filogeografiche tra le entità di *Pancratium* analizzate sono state discretamente risolte ed è quindi possibile formulare alcune ipotesi sui modelli d'evoluzione di queste piante.

Dalle nostre analisi, è possibile osservare che *P. illyricum* ha evidenziato il più alto numero di autoapomorfie rispetto alle altre specie di *Pancratium* analizzate con le quali si pone in relazione di *sister group* (Fig. 6). Tali risultati molecolari sono suffragati anche dai dati morfologici riportati da Valsecchi (1982). Infatti, l'autore evidenzia che *P. illyricum* è molto differente dalle altre specie di *Pancratium* per diversi caratteri morfologici (perigonio eretto-patente; la corona piccola e formata da sei lacinie indipendenti dai tepali, corte bifide a lobi divergenti e acuminati; gli stami liberi dalla corona e situati alla fauce del tubo corollino; antere a logge interamente unite; ovuli distribuiti entro la loggia in più file; spata bivalve). Inoltre, dalle analisi effettuate in questo studio, si può affermare che il più recente comune ancestore tra *P. illyricum* e gli altri taxa di *Pancratium* aveva un *range* di distribuzione che includeva molto probabilmente il blocco Sardo-Corso. In seguito però, tale ancestore potrebbe essere stato sottoposto sia ad eventi di dispersione sia ad eventi di vicarianza (Fig. 7). Questa informazione è coerente se si considera l'affascinante storia geologica del Mediterraneo (Biju-Duval et al., 1976; Rosenbaum et al., 2002, 2004; Popov et al., 2006; Thompson, 2010) e gli studi biogeografici sulle Amaryllidaceae (Meerow et al., 2006; Santos-Gally et al., 2011). Infatti, come anche affermato da Meerow et al. (2006), il comune ancestore dei cladi di

*Pancratium* e *Narcissus-Sternbergia* potrebbe essersi originato tra la Penisola Iberica e il sud della Francia. Questo è confermato anche da Santos-Gally et al. (2011) per il genere *Narcissus*. Inoltre, è da considerare che attualmente il Mediterraneo è il prodotto di complessi movimenti tettonici tra microplacche iniziato già almeno all'inizio del Terziario; durante il Cretaceo (120-65 Ma) infatti, la convergenza delle placche terrestri ha causato l'unione tra l'Africa e l'Europa (Biju-Duval et al., 1976; Thompson, 2010), portando alla formazione di collegamenti terrestri e alla nascita dell'antica Tetide (ancestore del Mar Mediterraneo). Simili collegamenti terrestri si vennero a creare anche tra il blocco Sardo-Corso e la placca Europea fino a dopo l'Oligocene; successivamente, nel tardo Miocene (~21 Ma), la placca Sardo-Corsa si staccò dall'Europa e ruotò verso sud-est nel mezzo del Golfo del Leone, formando così il Mar Ligure. Questo modello potrebbe quindi spiegare i possibili eventi di dispersione e/o vicarianza avvenuti tra Africa, Corsica, Europa occidentale e Sardegna, giustificando così la provenienza del comune ancestore di *Pancratium*.

Dopo la separazione di *P. illyricum*, sono visibili tre maggiori cladi: (1) *P. zeylanicum*, *P. maximum* e *P. tenuifolium*; (2) *P. canariense*, *P. tortuosum*, *P. trianthum* e *P. hirtum*; (3) e *P. foetidum*, *P. sickenbergeri*, *P. arabicum*, *P. linosae* e *P. maritimum*. Alle origini sia del clado 1 che del clado 2, sembra sia coinvolto un ancestore comune che era presente in Africa tropicale; nel primo clado, inoltre, potrebbe essersi verificata una migrazione verso l'Asia (*P. zeylanicum*). Invece, alle origini del clado (3), sembra ci sia stato un ancestore presente nell'Africa settentrionale (Fig. 7).

I risultati ottenuti in questo lavoro non sempre trovano coincidenza con i dati di tassonomia presenti in letteratura, soprattutto per le posizioni e i rapporti filogenetici che intercorrono tra i seguenti taxa: *P. tenuifolium*, *P. hirtum*, *P. trianthum*, *P. arabicum* e *P. linosae*.

Secondo uno studio morfologico di Björnstad (1973), *P. tenuifolium* probabilmente si è evoluto da *P. trianthum*, attraverso una riduzione del numero e della dimensione dei fiori, lo sviluppo delle pubescenze, e l'evoluzione delle foglie; l'autore inoltre suggerisce che in seguito le specie sarebbero migrate a est e a sud dell'Africa. Come riportato anche in dati morfologici più recenti (El-



Hadidy et al., 2011), *P. tenuifolium* è strettamente collegato a *P. trianthum* e *P. maximum*, ma gli autori sottolineano che le specie sono facilmente distinguibili attraverso la morfologia dei fiori e delle foglie. Invece i dati ottenuti nella mia analisi confermano che *P. tenuifolium* è strettamente collegato a *P. maximum*, ma che le somiglianze osservate tra *P. tenuifolium* e *P. trianthum* possono essere considerate omoplasie. Inoltre, *P. tenuifolium* e *P. maximum* hanno un areale di distribuzione parzialmente sovrapposto (fascia orientale dell’Africa tropicale) che potrebbe aver giocato un importante ruolo almeno all’origine del loro comune antenitore.

Un’altra incongruenza con la letteratura precedente è la posizione di *P. hirtum*. Secondo diversi autori (Hepper, 1968; Björnstad, 1973; Burkill, 1985), *P. hirtum* è in sinonimia con *P. tenuifolium*; altri autori, al contrario, non accettano tale sinonimia (Morton, 1965; Nordal, 1982; Oyewole, 1988; Oyewole & Mustapha, 1990; Akoègninou et al., 2006).

I dati ottenuti in questo studio (Fig. 7) invece evidenziano che *P. hirtum* non ha avuto rapporti diretti con *P. tenuifolium*, a differenza di *P. trianthum*, con il quale condivide il 100% d’identità di sequenza. Tuttavia Morton (1965), attraverso esperimenti d’impollinazione artificiale tra *P. hirtum* e *P. trianthum*, aveva rilevato che tutti gli ibridi ottenuti erano sterili, indipendentemente dalla direzione dell’incrocio. L’autore aveva concluso che *P. hirtum* poteva essere una specie buona e non menzionava nessuna possibile sinonimia con *P. tenuifolium* (come erroneamente riportato da Björnstad, 1973). Alla luce di questi dati, l’identità di sequenza tra *P. hirtum* e *P. trianthum*, ottenuta dalle mie analisi, si potrebbe giustificare in diversi modi: (1) i marcatori molecolari impiegati non sono capaci di discriminare tra queste entità; (2) la specie analizzata è un prodotto di ibridazione tra *P. trianthum* (femmina) e *P. hirtum* (maschio); (3) le due entità realmente appartengono alla stessa specie. Tuttavia dai dati a disposizione si può solo ipotizzare che la specie analizzata sia realmente un ibrido, visto che le due specie (“parentali”) mostrano caratteri morfologici distintivi (Morton, 1965) e sono simpatriche; si può inoltre scartare l’ipotesi (1) poiché i marcatori molecolari utilizzati in questo lavoro hanno mostrato un buon tasso di mutazione che discrimina molto bene sia tra la maggioranza delle altre specie di *Pancregium* analizzate sia nei generi affini (Santos-Gally et al.,

2011).

Proseguendo ad analizzare il clado successivo si osserva che *P. trianthum* e *P. hirtum* risultano *sister* a *P. tortuosum*. Le differenze tra questi taxa sono molte, e spaziano dalla morfologia (El-Hadidy et al., 2011), al habitat e all'areale di distribuzione. In dettaglio, *P. trianthum* è distribuito nel nord ed a est dell'Africa tropicale, e cresce in ristrette zone soleggiate, tra le rocce e la savana, mentre *P. tortuosum* ha un'areale di distribuzione più ristretto (dall'Egitto all'Eritrea, ovest della penisola Arabica) e cresce in terreni sabbiosi desertici e su pendenze ghiaiose e rocciose. Inoltre una delle particolarità di *P. tortuosum* è la presenza di foglie molto spirolate e attorcigliate.

Proseguendo nelle analisi il clado costituito da *P. trianthum*, *P. hirtum* e *P. tortuosum* è risultato in relazione di *sister group* con *P. canariense*. Quest'ultima specie è endemica delle Isole Canarie, arcipelago vulcanico localizzato nell'Oceano Atlantico, tra circa 100 e 500 Km dalle coste a nord-ovest del Sahara. Dalle analisi effettuate in questo lavoro si evince che l'ancestore di *P. canariense* era presente molto probabilmente in Africa tropicale. Tra le entità di *P. canariense* provenienti da Tenerife e da Gran Canaria è stata ritrovata una grande variabilità molecolare; tuttavia per l'interpretazione di quest'ultimo dato sarà necessario uno studio più approfondito con campionamenti più estesi. Ciononostante i dati a nostra disposizione ci permettono di ipotizzare che *P. canariense* si sia originato dalle specie continentali di *Pancratium* grazie a complessi fenomeni di dispersione e/o vicarianza.

Infine, considerando l'ultimo clado terminale, è molto interessante la posizione filogenetica di *P. foetidum* che è *sister* al resto dei cladi (*P. arabicum*, *P. linosae*, *P. maritimum* e *P. sickenbergeri*). *Pancratium foetidum* è una specie endemica dell'Africa settentrionale (dal Marocco alla Tunisia) e cresce in terreni aridi. Uno dei problemi che ha causato discussione tra i tassonomi è il numero di varietà di *P. foetidum*. Infatti, in accordo con Battandier (1919) e Maire (1936, 1938), la specie comprende 5 varietà che sono: var. *brachysiphon* Maire, var. *oranense*, var. *rifanum* Maire, var. *saldense* Batt. e var. *tunetanum*. Le differenze tra queste varietà si riferiscono principalmente alle dimensioni dei fiori, dei bulbi e dei semi. Dai risultati ottenuti in questo lavoro si è osservato che gli

individui di *P. foetidum* provenienti dalla Tunisia (var. *tunetatum*) e dall'Algeria (var. *oranense*) presentano una variabilità molecolare molto elevata. Tali risultati evidenziano la necessità di una revisione tassonomica di questa specie e uno studio filogeografico più approfondito.

Alla luce dei risultati ottenuti in questo lavoro, è chiaro che *P. foetidum* è filogeneticamente molto vicino a *P. sickenbergeri*, che a sua volta è *sister* a *P. maritimum*. In origine queste specie condividevano un ancestore comune il cui areale di distribuzione si estendeva in tutta l'Africa settentrionale (B: 100%); in seguito si sono verificati eventi di dispersione (Fig. 7) che hanno condotto all'attuale distribuzione delle specie terminali.

Degno di nota sono alcune caratteristiche morfologiche che accomunano stranamente due specie filogeneticamente distanti che sono *P. sickenbergeri* e *P. tortuosum*. Entrambe le specie, infatti, presentano foglie spiralate e attorcigliate ed inoltre entrambe condividono la medesima nicchia ecologica (il deserto). Tuttavia i risultati ottenuti in questo lavoro indicano stranamente che queste similitudini sono omoplasie. Le foglie spiralizzate, infatti, si possono considerare un adattamento alle estreme condizioni climatiche presenti nel deserto, attraverso la riduzione della superficie in contatto con l'aria.

Infine, all'interno dell'ultimo clado terminale è molto interessante l'identità di sequenza osservata tra *P. arabicum*, *P. linosae* e *P. maritimum*. In realtà in passato già erano nate tra i tassonomi delle discussioni circa le origini e le distinzioni tra queste tre specie.

*Panocratium arabicum*, endemico di una piccola area dell'Egitto, è una specie ampiamente riconosciuta (Boulos, 2005; Dobignard & Chatelain, 2010; El-Hadidy et al., 2011), sebbene condivide molte caratteristiche morfologiche con *P. maritimum*, come indicato da Täckholm & Drar (1954) e Täckholm (1974). Questi ultimi autori non hanno accettato *P. arabicum* come specie e lo considerano solo come una variante di *P. maritimum*. Tuttavia Sickenberger (1901) aveva sottolineato alcune differenze tra queste specie: (1) *P. arabicum* presenta scapo laterale, che appare prima delle foglie; le capsule sono pedicellate, con valve oblunghe ovate, non emarginate; (2) *P. maritimum* ha uno scapo terminale, contemporaneo con le foglie; le capsule sono sessili con valve

arrotondate emarginate. Invece, secondo quanto affermato da Täckholm & Drar (1954), questi caratteri mostrano un'ampia fluttuazione e non sono adatti per discriminare le due specie. La principale differenza, tuttavia, è nelle guaine membranose cartacee alla base delle foglie di *P. arabicum*, che sono assenti in *P. maritimum*; inoltre *P. arabicum* ha un rivestimento più robusto, foglie più larghe, ombrelle più ricche e fiori più grandi.

Molto interessanti sono anche i rapporti tra *P. linosae* (endemico dell'Isola Linosa) e *P. maritimum*. Le differenze morfologiche tra queste due specie sono correlate alla struttura delle foglie come descritto da Lojacono-Pojero (1908) e da Nicastro (2003-2004). Tuttavia, un recente studio morfometrico condotto da Di Silvestro et al. (2010) su due popolazioni di *P. linosae* (circa 40 individui ognuna), ha mostrato che la variabilità morfologica di *P. linosae* è ascrivibile a quella di *P. maritimum*. Quanto riportato da Di Silvestro et al. (2010) è confermato anche dai risultati molecolari ottenuti in questo lavoro.

In ultima analisi, come evidenziato finora, la maggioranza delle specie discusse in questo lavoro hanno un limitato *range* geografico; *P. maritimum* invece cresce nelle coste sabbiose del Mediterraneo fino al Mar Nero e al Mar Caspio, incluso parte delle coste Atlantiche. Sicuramente, il cambiamento di habitat verso le dune sabbiose si è verificato molto probabilmente attraverso un antenato simile a *P. sikenbergeri*, che ha sviluppato adattamenti che hanno permesso la colonizzazione delle spiagge, che rappresentavano una nicchia ecologica non ancora sfruttata dalle altre specie di *Panocratium*. La dispersione di questa specie lungo tutto il suo areale è stata favorita dalla straordinaria capacità di galleggiamento dei suoi semi (Werker & Fahn, 1975).

I risultati di questo studio hanno fornito un inequivocabile modello di relazioni tra le specie di *Panocratium* lasciando, tuttavia, l'incertezza sui rapporti di uno dei cladi che comprende due raggruppamenti di cui uno è costituito da *P. zeylanicum*, *P. maximum* e *P. tenuifolium* e l'altro da *P. canariense*, *P. tortuosum*, *P. hirtum* e *P. trianthum*.

Future indagini dovrebbero affrontare questa mancanza di risoluzione e dovrebbero includere nelle analisi anche i taxa di *Panocratium* asiatici che non sono stati presi in considerazione in questo

studio. Infatti, per alcune specie indiane (ad esempio *P. parvum*, *P. triflorum* e *P. verecundum*) ci sono poche informazioni. Brevemente, i taxa asiatici sono costituiti prevalentemente da piante tropicali, adattate all'alternarsi di stagioni piovose e stagioni secche ed alcuni di essi presentano aspetti citogenetici interessanti. Per esempio, *P. verecundum* ha individui che sono autoploiploidi con un numero di base ( $n = 11$ ) e 0-3 B-cromosomi (Zaman & Nessa, 1974). Generalmente è riportato che *Pancratium* non mostra differenze del cariotipo, con un numero cromosomico di base di  $n = 11$  (*P. canariense*, *P. illyricum*, *P. longiflorum*, *P. maritimum*, *P. hirtum*, *P. sickenbergeri* e *P. zeylanicum*) (IPCN, *Index to Plant Chromosome Numbers*, <http://www.tropicos.org / Project / IPCN>), ma diversi conteggi dei cromosomici somatici riportano multipli di 9, 10, 11, 12 e 23 (Sato, 1938). Per questi motivi potrebbe essere utile effettuare ulteriori indagini kariologiche per ottenere dati atti ad aumentare la comprensione della filogenesi del genere.

# Capitolo 11

## Obiettivo II

### “Caratterizzazione di marcatori microsatellitari in *Pancratium maritimum* L.”

Gli studi effettuati su *P. maritimum* ci consentono di avere molte informazioni circa l'impollinazione (Eisikowitch & Galil, 1971, Medrano et al., 1999, 2000), la morfologia del polline (Donmez & Ilk, 2008), la dispersione del seme (Arcangeli, 1896) e la sua germinazione (Keren & Evenari, 1974, Balestri & Cinelli, 2004). Tale pianta coltivata per anni per scopi ornamentali, è anche un'importante fonte di alcaloidi e alginati (Sanaa et al., 2013).

Purtroppo la presenza di questa specie, una volta cospicua, attualmente si è sensibilmente ridotta a causa dell'intervento antropico. Un esempio importante è la completa scomparsa di popolazioni naturali di *P. maritimum* nell'Isola d'Ischia a causa dell'impatto umano sulle spiagge (Ricciardi et al., 2004). Ad oggi questa specie non è stata ancora inserita nelle liste IUCN e sono disponibili pochi studi sul suo stato di pericolo nel Mediterraneo (Zahreddine et al., 2004 per il Libano; Grassi et al., 2005 per il versante tirrenico dell'Italia settentrionale; Sanaa & Fadhel, 2010, per la Tunisia). Tali studi confermano lo stato precario della pianta dal punto di vista conservazionistico e rivelano la necessità di intraprendere programmi di conservazione della specie.

Attualmente i dati genetici sono considerati fondamentali per formulare appropriate strategie per la salvaguardia delle specie vegetali a rischio (Cardoso et al., 1998). L'analisi molecolare di individui raccolti da popolazioni diverse può sicuramente evidenziare polimorfismi a livello del genoma ed è un importante strumento per identificare particolari popolazioni che meritano una gestione separata e una priorità maggiore per la conservazione.

A tal proposito lo scopo di questo studio è stato sviluppare un set di marcatori microsatellitari nucleari utili all'analisi della variabilità genetica intraspecifica di *P. maritimum* entro gran parte del

suo areale di distribuzione. Questo set di marcatori è stato messo a punto specificamente per il presente studio, in quanto non erano presenti in banca dati marcatori specifici per *P. maritimum*. A tal proposito è stato ottimizzato un nuovo protocollo di costruzione della libreria di SSR per l'isolamento di loci microsatellitari.

Un requisito fondamentale da considerare quando si vuole sviluppare un protocollo per la costruzione di una libreria SSR è la conoscenza della tipologia di genoma in studio; ci sono infatti molte differenze tra genomi animali e vegetali e anche tra specie vegetali diverse. Le piante hanno una percentuale di sequenze SSR inferiore ai vertebrati e maggiore rispetto ai genomi dei funghi e degli invertebrati (Toth et al., 2000; Morgante et al., 2002). Queste differenze sono imputabili alla diversa quantità di DNA a singola copia e di DNA non ripetitivo (per esempio i retrotrasposoni). A differenza degli animali, le piante mostrano una grande variabilità nelle dimensioni del genoma che è generalmente più grande a causa della presenza di grandi quantità di DNA ripetitivo (San Miguel et al., 1998; Morgante et al., 2002).

In questo studio è stato ottimizzato un nuovo protocollo per la costruzione di una libreria arricchita di SSR per *P. maritimum* e che è risultato essere anche rapido, economico e semplice da eseguire. In Figura 9 è mostrato un confronto tra il protocollo ottimizzato in questo lavoro e altri protocolli di isolamento di microsatelliti. Per tale confronto sono stati considerati sia i protocolli tradizionali che prevedono un arricchimento e un'ibridazione selettiva, sia i protocolli che utilizzano metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS: tecnologie di sequenziamento 454 e Illumina). I protocolli tradizionali selezionati per il confronto sono quelli di Edwards et al. (1996), che è stato sviluppato per le piante (orzo, mais, rododendro, girasole, barbabietola da zucchero, frumento, e salice) e il FIASCO (Zane et al., 2002), che è stato usato per gli animali (passero delle rocce, orate dalla testa dorata, rana pescatrice americana e corallo rosso). Entrambe le procedure riportavano una resa elevata (> 50%) che si è tentato di riprodurre in laboratorio ma con scarso successo. Utilizzando il protocollo di Edwards et al. (1996) per esempio si è avuta una

resa minore del 2% ed inoltre tale protocollo ha richiesto molto tempo per la fase di ibridazione selettiva (questo dato è stato confermato anche da Zane et al., 2002).

Di seguito sono discussi i miglioramenti più rilevanti apportati nel protocollo ottimizzato in questo studio rispetto agli altri due esaminati:

- la scelta degli enzimi di restrizione è stato il passo più importante che ha influenzato la resa finale. Molto spesso, gli enzimi indicati nei protocolli possono essere modificati in caso si rilevi una digestione inefficiente. Utilizzando l'enzima riportato nel protocollo di Edwards (*RsaI*) si è avuta una digestione parziale del DNA. Secondo dati di letteratura questo problema è stato riscontrato anche da Fischer e Bachmann (1998) e King et al. (2008). Per ridurre il tempo richiesto per l'ottimizzazione di protocolli, una buona strategia è quella di utilizzare enzimi noti per essere dei buoni “tagliatori” in diversi templati come per esempio quelli impiegati nella tecnica AFLP, cioè *EcoRI* e *MseI* (Vos et al., 1995). La procedura FIASCO prevede l'utilizzo di *MseI* soltanto. Nel protocollo ottimizzato in questo lavoro invece, si è preferito utilizzare la classica e ben collaudata coppia di enzimi *EcoRI* + *MseI*. Ciò ha permesso di ottenere frammenti di DNA digerito delle dimensioni adatte per le fasi successive (ossia, l'amplificazione e il clonaggio).
- Un'altra fase fondamentale del protocollo ottimizzato in questo studio è stata la selezione di frammenti di DNA digerito di piccole dimensioni (250-500 bp) tramite estrazione da gel e purificazione. Ottenere frammenti piccoli da clonare offre il vantaggio di poter utilizzare kit di clonaggio più economici. Il protocollo FIASCO, invece, necessita di kit di clonaggio molto costosi poichè produce frammenti di DNA più grandi (200-1000 bp).
- Un fattore non trascurabile nella costruzione di una libreria di SSR è la scelta della temperatura di appaiamento da utilizzare durante la reazione di ibridazione dei frammenti digeriti con la sonda biotinilata. Né Edwards et al. (1996) nè FIASCO riportano dettagli in tal senso. Il



protocollo di Edwards et al. (1996) infatti prevede una temperatura di appaiamento molto bassa (37°C per 24 h) e ciò produce livelli alti di segnali aspecifici. In FIASCO invece il DNA viene ibridato secondo le indicazioni riportate nel protocollo pubblicato *online* da Travis Glenn. Purtroppo, questo protocollo non è più disponibile online. Tuttavia, nel protocollo SSR ufficiale pubblicato dall'autore (Glenn & Schable, 2005), viene sottolineata l'importanza della scelta della temperatura di appaiamento della sonda e viene utilizzata una temperatura moderata di 50°C per 10 min.

Oltre a tali miglioramenti, in questo lavoro si è cercato di apportare anche delle novità rispetto ai protocolli preesistenti e sono ad esempio: 1) l'introduzione di una fase di estensione iniziale durante la fase di amplificazione del primo arricchimento (fase 5) per riempire i “*nick*” presenti nei prodotti di ligasi (fase 4), (2) l'utilizzo di Vectrex ® avidina D (Vector Laboratories Inc.) invece del sistema streptavidina-sferette metalliche previsto dal protocollo FIASCO. Ciò consente di catturare la miscela di ibridazione grazie all'utilizzo di una normale centrifuga piuttosto che di un campo magnetico (fase 7); e (3) riduzione del costo effettivo del sequenziamento di Sanger (fase 9) grazie all'ottimizzazione eseguita usando Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Infine, in Figura 9 vengono mostrati i vantaggi in termini di risparmio di costi e tempi di questo nuovo protocollo rispetto ai protocolli preesistenti.

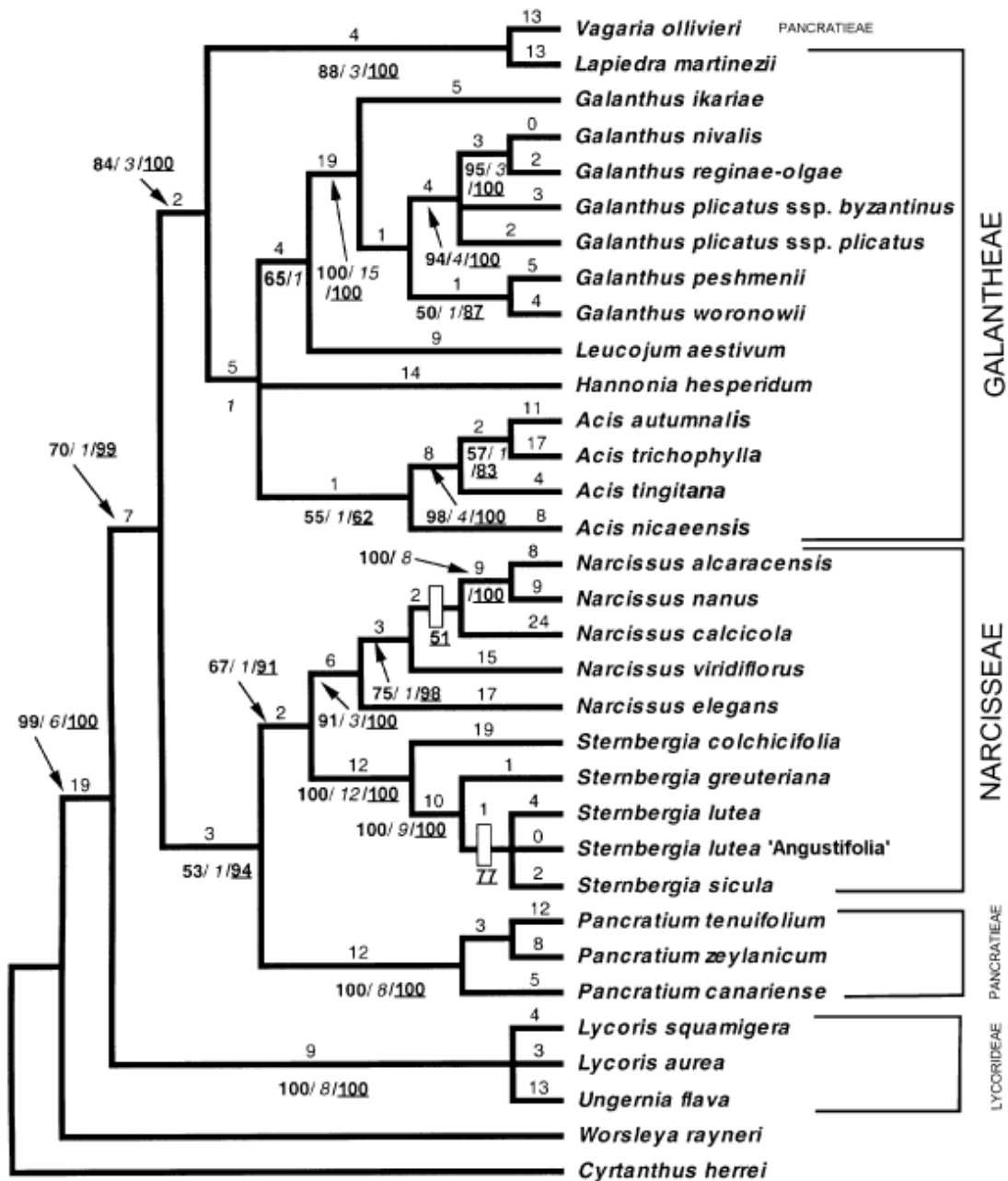
Il protocollo ottimizzato in questo studio è stato utilizzato per isolare loci microsatellitari in *P. maritimum*. Il primo risultato ottenuto è stato quello di aver avuto amplificazioni positive in 21 dei 38 loci testati. Inoltre i microsatelliti sono risultati molto informativi per le analisi della genetica di popolazione, infatti si sono ottenuti alcuni loci con valori di PIC anche molto alti con un massimo di 0,8 per il locus SSR38 e con un valore medio per tutti i loci pari a 0,4.

Tra i loci isolati sono stati scelti i quattro che presentavano valori di PIC maggiori e sono stati utilizzati per effettuare l'analisi genetica in 24 popolazioni provenienti da zone che rispecchiassero l'intero areale di distribuzione di questa pianta.

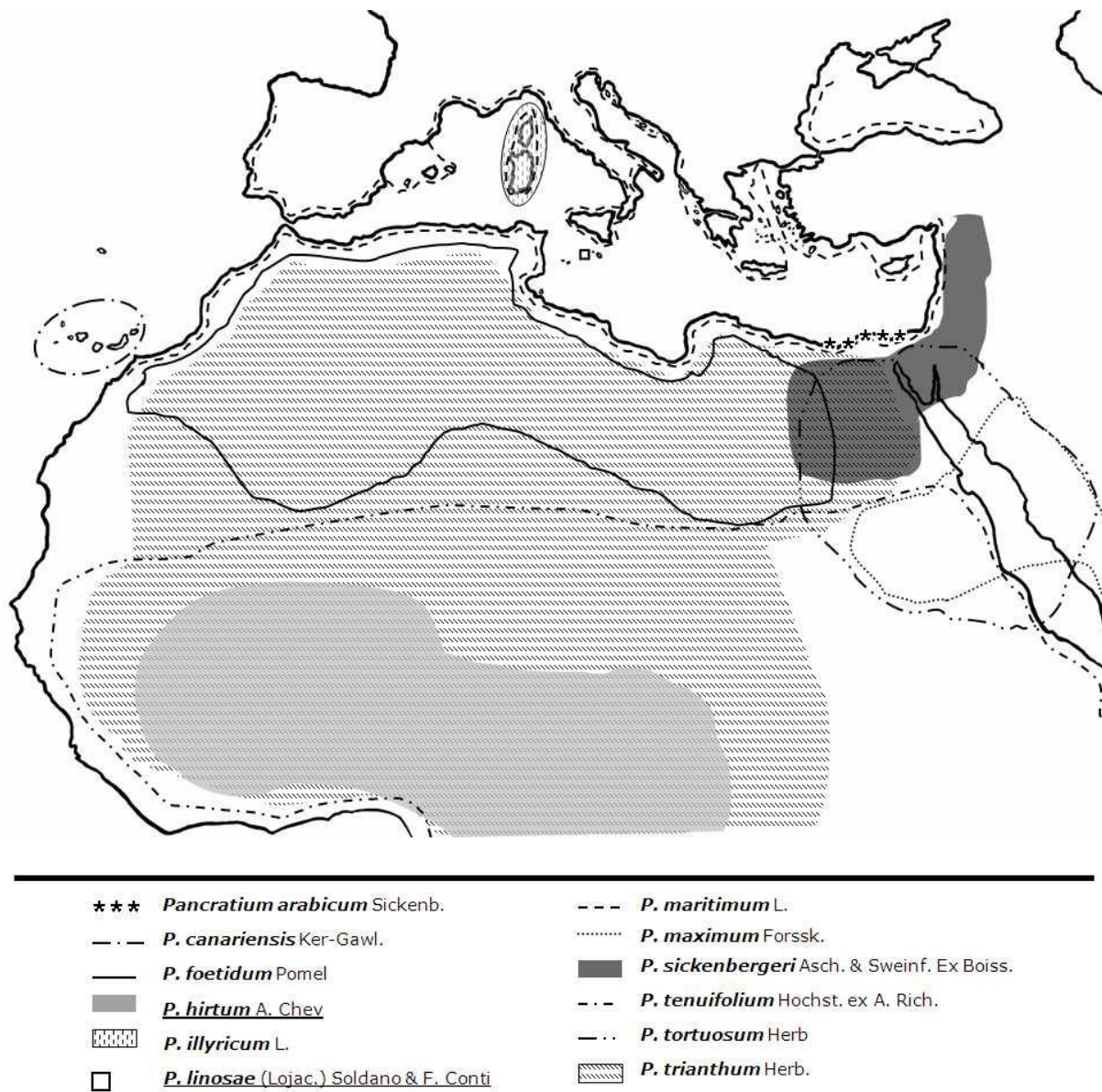
Le analisi di diversità genetica tra le specie sono un importante strumento per programmi di conservazione (Hamrick et al., 1991; Geburk, 1997; Crawford et al., 2001). Dalle analisi effettuate in questo studio si sono avuti valori di  $F_{st}$  (0,26) significativi che indicano un consistente differenziamento genetico tra le popolazioni analizzate. Inoltre i valori di eterozigosità media osservata pari a 0,48 mostrano un buon livello di variabilità genetica all'interno delle popolazioni. Tuttavia questi risultati si discostano dai dati ottenuti per le popolazioni della Spagna. Queste infatti, mostrano livelli di eterozigosità ridotte e valori di  $F_{is}$  positivi che indicano un sostanziale eccesso di omozigoti dovuto probabilmente a riproduzione vegetativa. Negli ultimi anni sulle coste spagnole si è assistito ad un progressivo depauperamento delle popolazioni di *P. maritimum* a causa della costante alterazione e distruzione del sistema dunale dovute all'eccessivo traffico durante il periodo estivo (Zahreddine et al., 2004 e referenze all'interno). Ciò potrebbe essere la causa della riduzione della variabilità genetica registrata nelle popolazioni analizzate. Conoscere i livelli di variabilità genetica all'interno delle popolazioni è molto importante per la sopravvivenza delle specie. Infatti, la riduzione dei livelli di variabilità genetica all'interno delle popolazioni può determinare una diminuzione della possibilità di resistere ai cambiamenti ambientali biotici e abiotici (Soule, 1980) con conseguente riduzione della capacità riproduttiva e della fitness.

I risultati ottenuti in questo studio, ancora preliminari, potranno essere confermati quando si disporrà di un numero di popolazione superiore a quello attuale e si potrà testare un numero maggiore di loci nucleari microsatellitari.

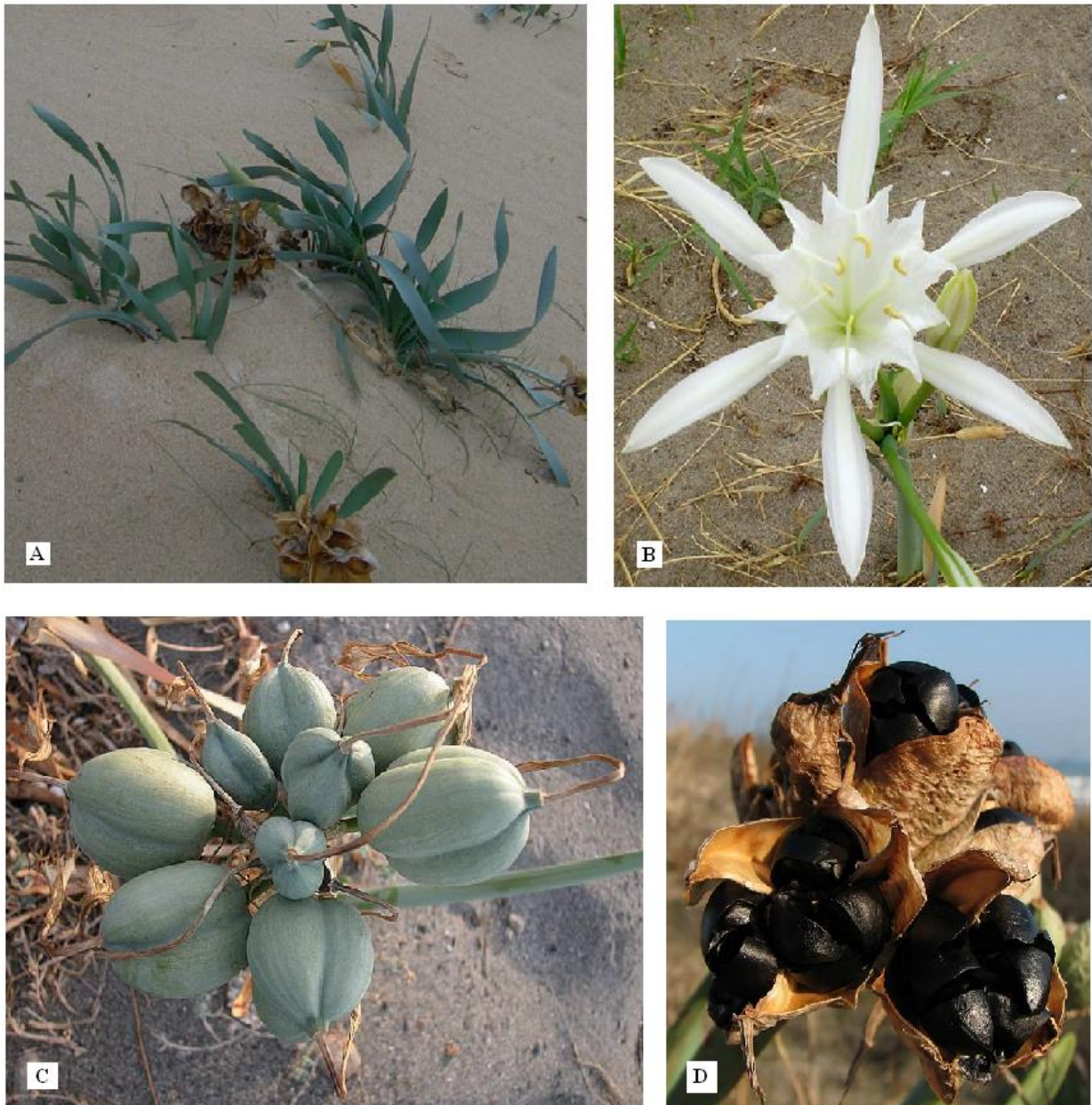
# FIGURE



**Fig. 1** - Uno degli otto alberi egualmente parsimoniosi costruiti sulla base dei dati del marcatore plastidiale *ndhF*. I numeri sopra i rami rappresentano la lunghezza del ramo. I numeri sotto i rami o indicati con la freccia sono le percentuali di BS/indice di decadimento (in corsivo)/valore PP( $se \geq 50\%$ ) basato su 9900 alberi derivati dall'analisi Bayesiana (sottolineato). La barra verticale bianca indica rami che collasano nel consenso stretto di tutti i quattro alberi (Meerow et al. 2006).



**Fig. 2** - Mappa geografica dei taxa di *Panocratium* oggetto di studio. I taxa sottolineati sono considerati specie in questione per la classificazione tassonomica.



**Fig. 3** – *Pancratium maritimum* L. A: foglie; B: fiore; C: frutto; D: semi.

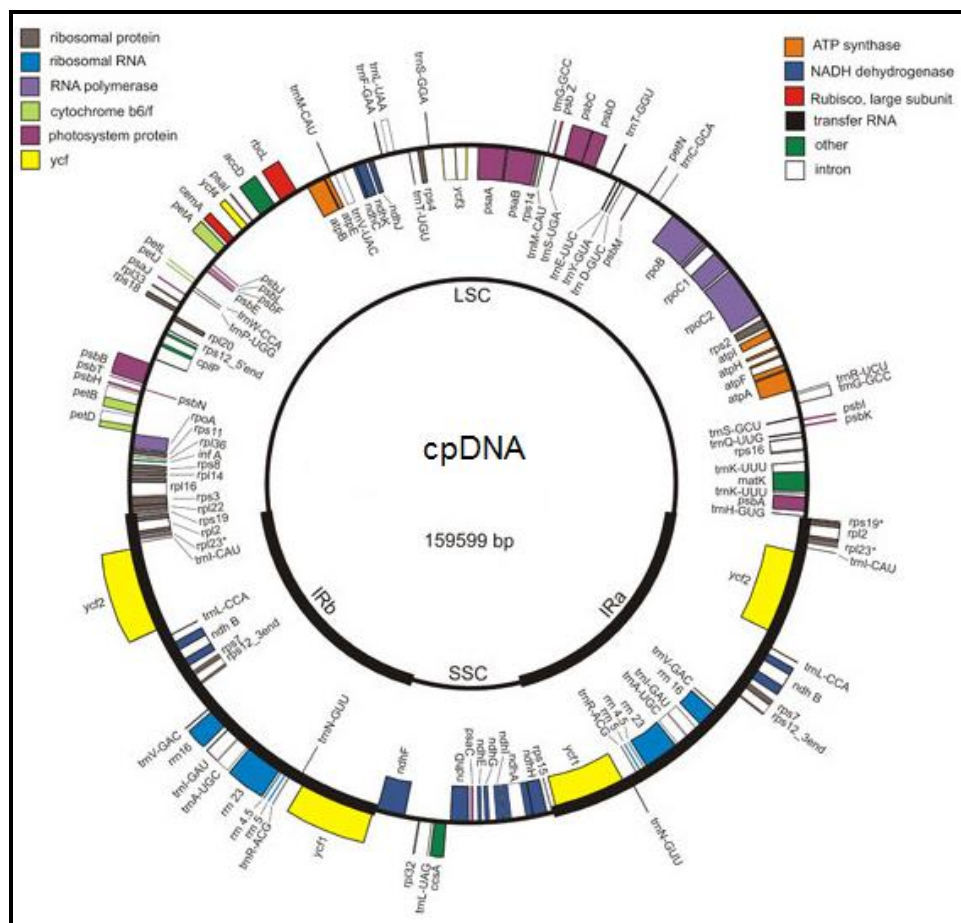
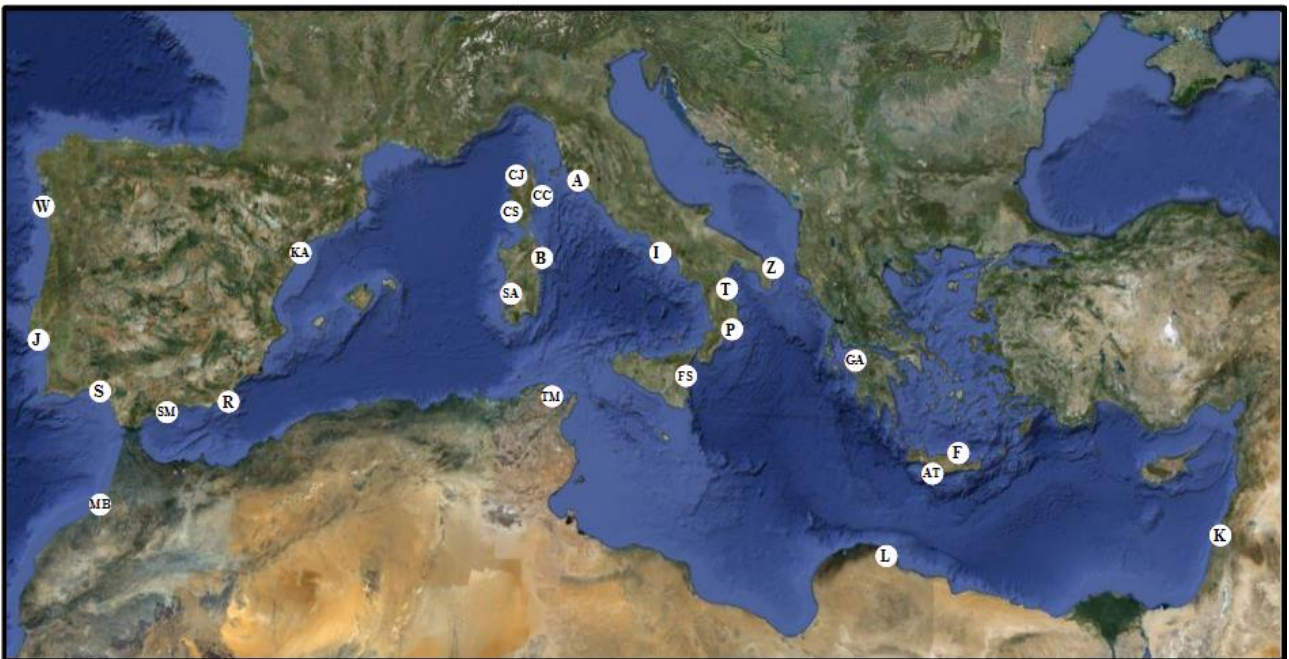
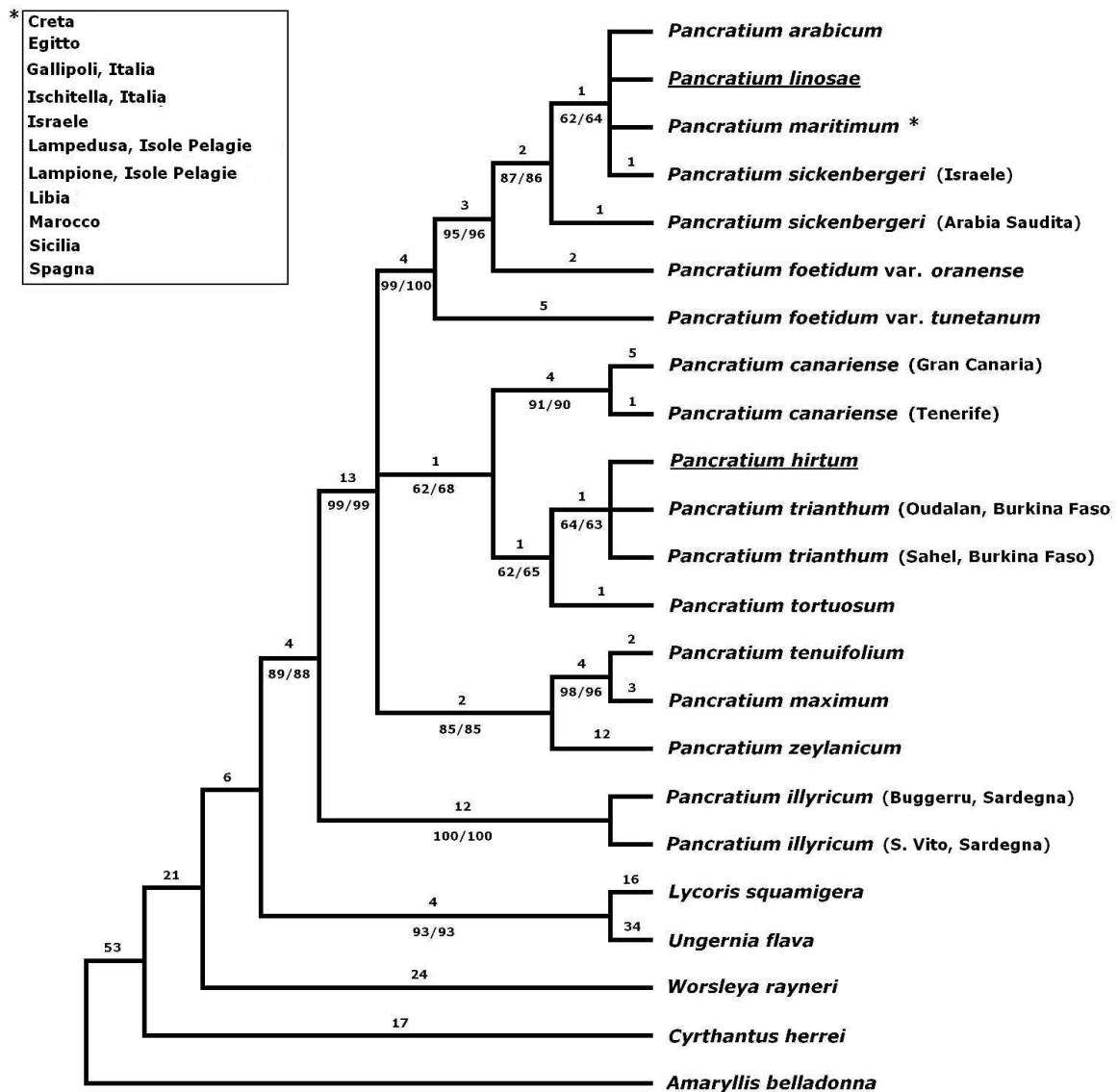


Fig. 4 – Struttura del genoma plastidiale.

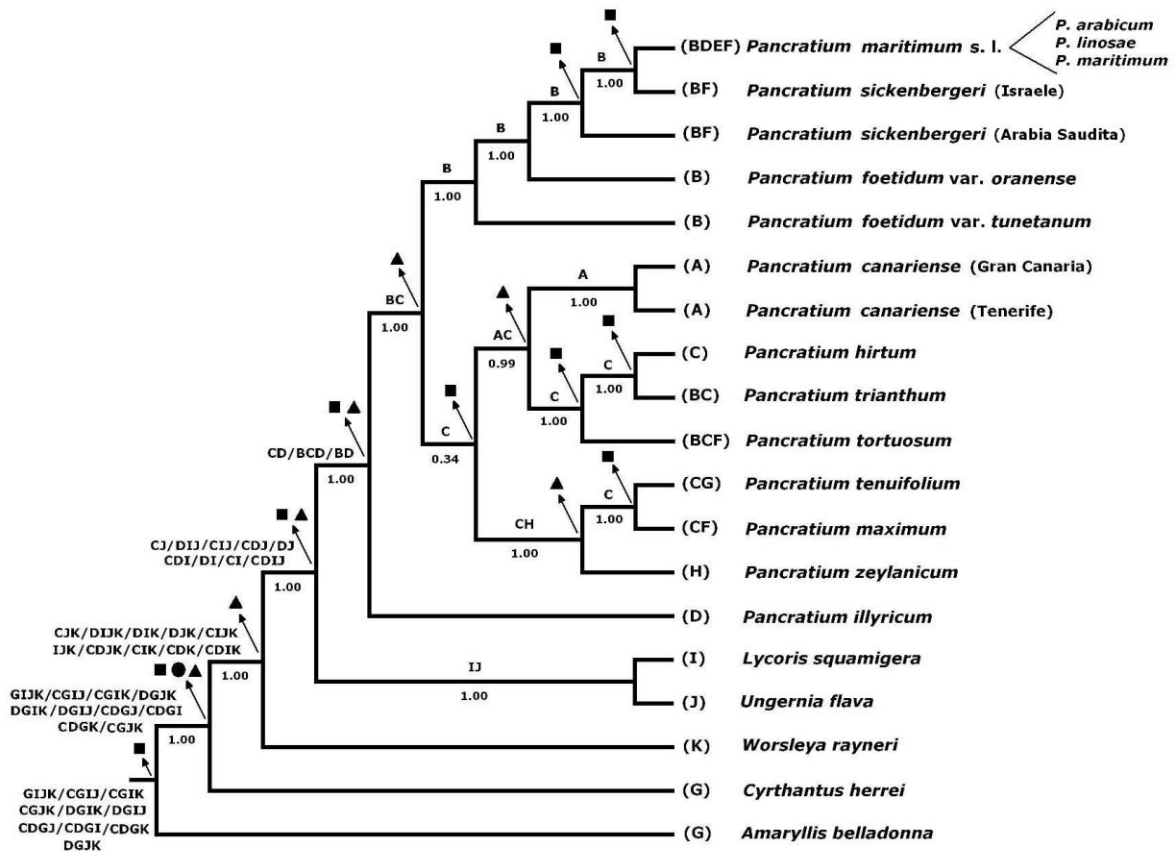


**Fig. 5** - Campionamento delle popolazioni di *Panocratium maritimum*.

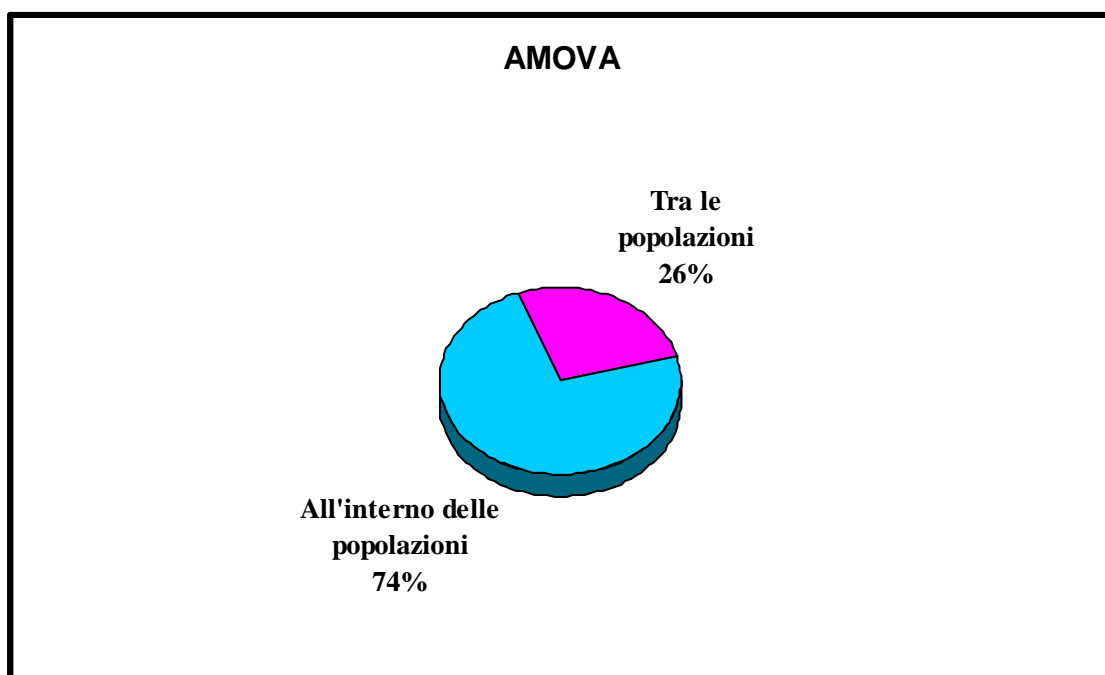




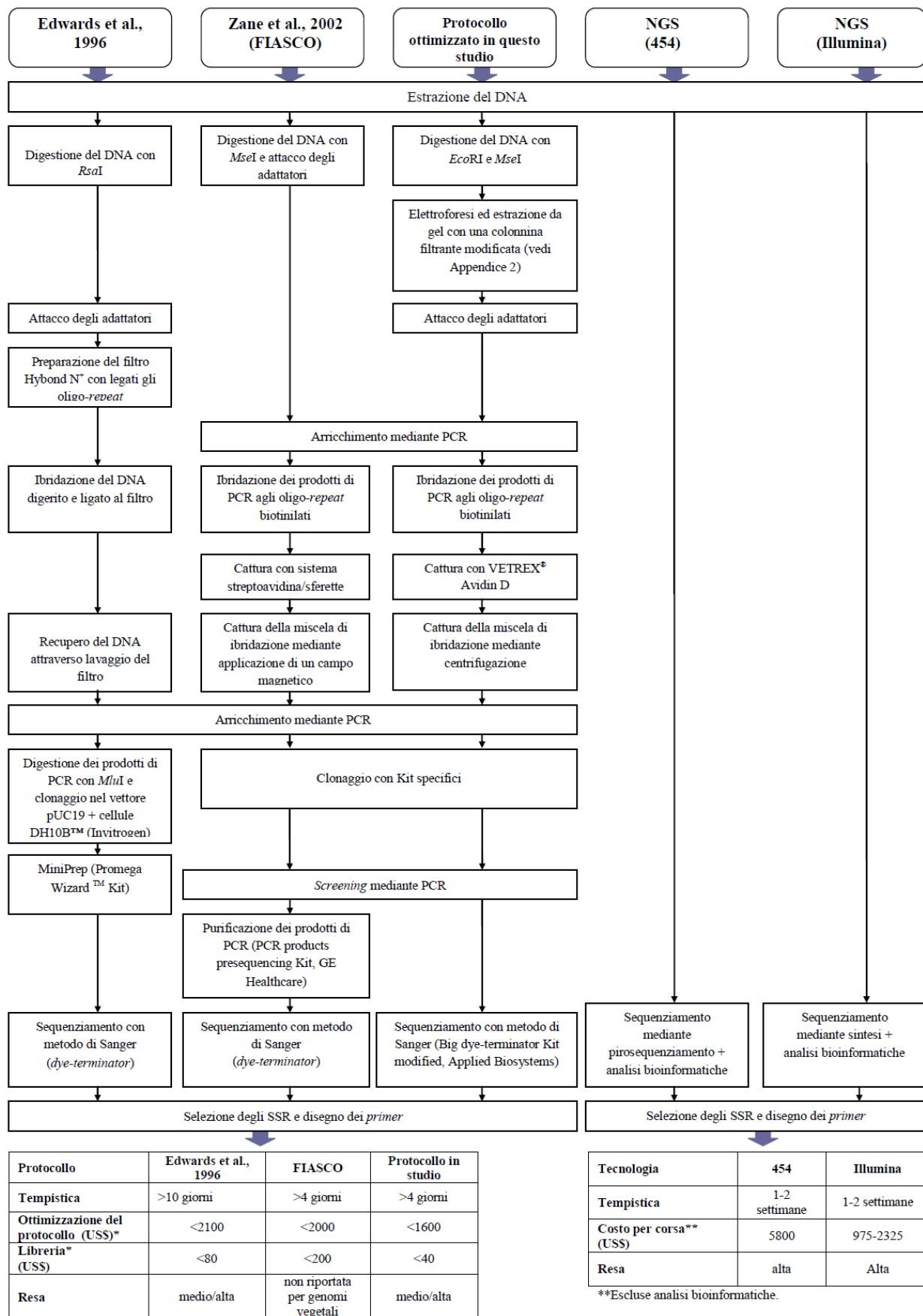
**Fig. 6** - Il cladogramma a Massima Parsimonia (MP) ottenuto dall'analisi dei marcatori plastidiali [gene *ndhF*, gene *rbcL*, spaziatore intergenico *trnL*<sup>(UAA)</sup>-F<sup>(GAA)</sup>, introne *trnL*<sup>(UAA)</sup>] presenta la stessa topologia dell'albero a Massima Probabilità (ML). I numeri sopra i rami rappresentano sinapomorfie, il primo numero sotto i rami indica i valori di *bootstrap* MP/ML al disopra del 50% (1000 replicati per MP / 500 replicati per ML). I taxa sottolineati vengono considerate specie in questione per la classificazione tassonomica.



**Fig. 7** – Albero di consenso di maggioranza ottenuto dall'analisi Bayesiana e ricostruzione dello scenario degli eventi di dispersione-vicarianza per *Pancratium* ottenuto attraverso l'ottimizzazione statistica con S-DIVA. I numeri al disotto dei rami sono i valori di PP. In accordo con i risultati molecolari e per una migliore risoluzione grafica, *P. arabicum* e *P. linosae* sono stati inclusi in *P. maritimum* (s.l., sensu lato). I taxa sottolineati sono considerati specie in questione per la classificazione tassonomica. Le 20 aree geografiche codificate sono indicate da lettere: A = Isole Canarie; B = Africa settentrionale; C = Africa tropicale; D = Corsica, Sardegna; E = area compresa tra la Penisola Balcanica e la Turchia, Francia, Italia, Portogallo, Spagna; F = Medio Oriente (dalla Siria al nord della Penisola Arabica); G = sud Africa; H = Asia meridionale (India, Sri Lanka); I = Asia orientale (Cina, Giappone, Korea); J = Asia centrale (Turkmenistan, Uzbekistan, Tajikistan, Kirghizistan e Kazakistan); K = sud America. Triangoli: eventi di vicarianza; cerchi: eventi di estinzione; quadrati: eventi di dispersione.



**Fig. 8** - Analisi della varianza molecolare (AMOVA). Percentuale della variabilità dovuta alle differenze tra le popolazioni e all'interno delle popolazioni.



**Fig. 9** – Schema comparativo dei costi e dei tempi previsti dal protocollo ottimizzato in questo lavoro e di altri protocolli di isolamento di microsatelliti

# TABELLE

<b>Taxon</b>	<b>Località</b>	<b>Voucher</b>	<b>gene <i>ndhF</i></b>	<b>gene <i>rbcL</i></b>	<b>spaziatore intergenico <i>trnF</i><sup>(GAA)</sup>- <i>trnL</i><sup>(UAA)</sup></b>	<b>introne <i>trnL</i><sup>(UAA)</sup></b>
<i>Pancreatium arabicum</i> Sickenb.	El Borollos, Egitto	De Castro P. 15347, NAP	HE603956	HE603957	HE603959	HE603958
<i>P. canariense</i> Ker Gawl.	Tenerife, Isole Canarie	19792812, NPB	FN594726	FN594922	FN597271	FN597256
<i>P. canariense</i>	Gran Canaria, Isole Canarie	19860521, E	HE565486	HE565502	HE565519	HE565536
<i>P. foetidum</i> Pomel var. <i>oranense</i> Batt.	Ain Temouchent, Algeria	Vela E., PFOE2, NAP	HE565487	HE565503	HE565520	HE565537
<i>P. foetidum</i> var. <i>tunetanum</i> Batt.	Belkhir, Tunisia	Médail F. & Pavon D. PFOE3, NAP	HE565488	HE565504	HE565521	HE565538
<i>P. hirtum</i> A. Chev.	Comoé, Burkina Faso	Neumann K., 735, FR: 0010315	HE565489	HE565505	HE565522	HE565539
<i>P. illyricum</i> L.	Buggerru, Sardegna	Brullo S., PanF, NAP	FN594728	FN594924	FN597273	FN597258
<i>P. illyricum</i>	S. Vito, Sardegna	Fois G., Pi1, NAP	FN594729	FN594925	FN597274	FN597259
<i>P. linosae</i> Soldano & F. Conti	Linosa, Isole Pelagie	Brullo S., PM4, NAP	FN594736	FN594932	FN597275	FN597260
<i>P. maritimum</i> L.	Casablanca, Marocco	Vallariello G., PMAR9, NAP	HE565490	HE565506	HE565523	HE565540
<i>P. maritimum</i>	Barcellona, Spagna	Napolitano G., PMAR8, NAP	HE565491	HE565507	HE565524	HE565541
<i>P. maritimum</i>	Gallipoli, Italia	De Castro O., M18, NAP	FN594732	FN594928	FN597278	FN597263
<i>P. maritimum</i>	Ischitella, Italia	Vallariello G., PMO, NAP	FN594733	FN594929	FN597279	FN597264
<i>P. maritimum</i>	Foce Simeto, Sicilia	De Castro O., FS13, NAP	FN594731	FN594927	FN597277	FN597262
<i>P. maritimum</i>	Lampione, Isole Pelagie	Brullo S., PM1, NAP	FN594735	FN594931	FN597281	FN597266
<i>P. maritimum</i>	Lampedusa, Isole Pelagie	Brullo S., PM3, NAP	FN594734	FN594930	FN597280	FN597265
<i>P. maritimum</i>	Darnah, Libia	Vela E., PMAR10, NAP	HE565492	HE565508	HE565525	HE565542
<i>P. maritimum</i>	Baltim, Egitto	Mashaly I. & Boulos L., 20245, K	HE565485	HE565501	HE565518	HE565535
<i>P. maritimum</i>	Elafonissi, Creta	Brullo S., PanE, NAP	FN594730	FN594926	FN597276	FN597261
<i>P. maritimum</i>	Gerusalemme, Israele	Leschner H., 2006, JBG	FN594737	FN594933	FN597282	FN597267
<i>P. maximum</i> Forsk.	Oman Botanic Garden, Sultanato dell'Oman	7/2011, OMN	HE565498	HE565509	HE565526	HE565543

<i>P. sickenbergeri</i> Asch. & Schweinf	Deserto del Negev, Israele	Brullo S., PM5, CAT	FN594739	FN594935	FN597284	FN597269
<i>P. sickenbergeri</i>	Tabuk, Arabia Saudita	Collinette J.S., 7260, K	HE565493	HE565510	HE565527	HE565544
<i>P. tenuifolium</i> Hochst. ex A. Rich.	Dire Dawa, Etiopia,	Westphal E. & Westphal-Stevens J.M.C., 1383, K	HE565494	HE565511	HE565528	HE565545
<i>P. tortuosum</i> Herb.	Dawadini Camp, Arabia Saudita	Collenette J.S., 4085, K	HE565495	HE565512	HE565529	HE565546
<i>P. trianthum</i> Herb.	Oudalan, Burkina Faso	Kuppers K., 1772, FR: 0010316	HE565496	HE565513	HE565530	HE565547
<i>P. trianthum</i>	Sahel, Burkina Faso	Schmidt V., 238, FR: 0026068	HE565497	HE565514	HE565531	HE565548
<i>P. zeylanicum</i> L.	Orto Botanico di Napoli, Italia	Naples Botanical Garden, NAP	HE565499	HE565515	HE565532	HE565549
<i>Amaryllis</i> <i>belladonna</i> L.	Orto Botanico di Napoli, Italia	Naples Botanical Garden, NAP	HE565552	HE565516	HE565533	HE565550
<i>Cyrtanthus herrei</i> (Leighton) RA Dyer	Cape town, sud Africa	184560, NBG	HE565500	HE565517	HE565534	HE565551
<i>Lycoris</i> <i>squamigera</i> Maxim.	Sud-est Cina, sud- centro Giappone	Embl	AY747079	AF116971	AF104733	AF104780
<i>Ungernia flava</i> Boiss. & Haussk.ex Boiss.	Nord-ovest Iran	Embl	AY434483	AF116987	AF104749	AF104797
<i>Worsleya rayneri</i> (Hook.f.) Traub & Moldenke	America	GenBank accession	AY747105	AF116989	AF104761	AF104774

**Tab. 1** - Specie, provenienza dei campioni e Genbank *accession number* delle sequenze utilizzate in questo lavoro. I taxa sottolineati sono considerati specie in questione per la classificazione tassonomica.

<i>Primer</i>	Sequenza (5'-3')	Riferimento bibliografico
<b><i>ndhF</i></b>		
Forward-F1	ATG GAA CAK ACA TAT SAA TAT GC	Olmstead et al. 1994
Reverse-F1318	CGA AAC ATA TAA AAT GCR GTT AAT CC	Olmstead et al. 1994
Forward-2F	ACT CAT GCT TAT TCG AAA GC	Graham et al. 1998
Reverse-1.6R	CCT ACT CCA TTG GTA ATT CCA T	Graham et al. 1998
Forward-Pan_ <i>ndhF1</i> -Fin	TAT TCG TCG TAT GTG GGC T	De Castro
Reverse-Pan_ <i>ndhF1</i> -Rin	TCT TTG GAC CAA AAA CAA GC	De Castro
Forward-Pan_ <i>ndhF2</i> -Fin	GGT TTA ACA AAA TAT GTT CC	De Castro
Reverse-Pan_ <i>ndhF2</i> -Rin	CTA ATC CTC TTA CAC CCA C	De Castro
<b><i>rbcL</i></b>		
Forward-1F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC	Meerow et al. 1999
Reverse-Pan_ <i>rbcL</i>	TTC ACG AGC AAG ATC ACG TC	De Castro
Forward Pan_ <i>rbcL</i> -fin	GGA TTAC CAG CCT TGA TCG	De Castro
<b>Introne <i>trnL</i><sup>(UAA)</sup> e spaziatore intergenico <i>trnL</i><sup>(UAA)</sup>-<i>trnF</i><sup>(GAA)</sup></b>		
Forward-c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet et al. 1991
Reverse-d	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Taberlet et al. 1991
Forward-e	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	Taberlet et al. 1991
Reverse-f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet et al. 1991

**Tab. 2** - Informazioni generali dei *primer* utilizzati in questo lavoro.



<b>Codice</b>	<b>Località</b>	<b>Latitudine</b>	<b>Longitudine</b>
<b>CJ</b>	Corsica, Anse de Minaccia	41°93'74"	08°62'32"
<b>CS</b>	Corsica, Plage de Puraja	41°67'49"	08°88'40"
<b>CC</b>	Corsica, Dune de Pinarellu	41°67'43"	09°37'32"
<b>F</b>	Creta, Village Malia	35°17'33"	25°27'20"
<b>AT</b>	Creta, Kalamaki	35°02'12"	24°45'18"
<b>GA</b>	Grecia, Dytiki Ellada	38°08'14"	21°22'09"
<b>K</b>	Israele, Herzliya	32°17'76"	34°80'16"
<b>P</b>	Italia, Marina di Pietrapaola	39°21'27"	16°01'53"
<b>T</b>	Italia, Marina di Sibari	39°44'38"	16°29'49"
<b>I</b>	Italia, Cuma	40°85'49"	14°04'75"
<b>A</b>	Italia, Marina di Palidoro	41°54'56"	12°08'30"
<b>Z</b>	Italia, Le Cesine	40°21'16"	18°20'51"
<b>L</b>	Libia, Kouf National Park	32°46'23"	22°38'43"
<b>MB</b>	Marocco, Bouknadel	34°07'19"	-06°45'31"
<b>J</b>	Portogallo, Arieiro	38°37'56"	-09°13'50"
<b>B</b>	Sardegna, Canniggione	41°06'44"	09°26'27"
<b>SA</b>	Sardegna, Oristano	39°50'50"	08°33'16"
<b>FS</b>	Sicilia, Foce Simeto	37°24'18"	15°05'28"
<b>W</b>	Spagna, Playa De Negras	42°25'15"	-08°40'32"
<b>R</b>	Spagna, Almeria	36°82'14"	-02°29'23"
<b>S</b>	Spagna, El Portil	37°12'17"	-07°02'00"
<b>KA</b>	Spagna, Ampolla	41°05'23"	01°11'38"
<b>SM</b>	Spagna, Malaga	36°88'22"	40°57'66"
<b>TM</b>	Tunisia, La Marsa	36°53'17"	10°19'45"

**Tab. 3** – Popolazioni e coordinate geografiche degli individui di *Pancratium maritimum* utilizzati in questo studio.

Locus	Sequenza dei primer (5'-3')	Fluorocromo	Motivo ripetuto	Intervallo lunghezza allelica (bp)	A	T <sub>a</sub> (°C)	PIC
SSR3	F: *TTGGTGCTTAGGTTTCGT R: CTAGATTTATACAGGTTCCG	FAM	(AG) <sub>8</sub> (TG) <sub>4</sub>	183-200	2	53	0,249
SSR7	F: *TAGTCGACTGCAACTAGGGA R: CCCATCCTACTCTCAAATCC	VIC	(GA) <sub>20</sub>	218-232	8	54,6	0,639
SSR8	F: *CTCAGGAAACAACCTTGAG R: GAAATACAGAACATCTAAGATAT	PET	(TC) <sub>22</sub> (TG) <sub>14</sub>	166-178	6	TD 58-50	0,450
SSR11	F: *CAGTGGTGGCGATGGTGCTG R: TCGCAATGACTTTGTCTCTCCCCT	FAM	(AG) <sub>22</sub>	176-219	7	63,1	0,267
SSR13	F: *TCCCTGTTTTTCTCTCTTCACT R: CAGGTCTTGGGCATCAAGGG	VIC	(TC) <sub>9</sub> (GT) <sub>47</sub>	205-225	5	61,3	0,466
SSR15	F: *GATATCCTCAAACGCC R: CGTCTTCCCCTTCTCTGG	VIC	(GA) <sub>8</sub>	218-234	8	53	0,589
SSR19**	F: *TCGACTCTGCCGAACCTGGG R: AACGTGCGTCGGATCTAGAGAGA	PET	(GTT) <sub>5</sub>	134-142	2	59,5	0,375
SSR20	F: *GACTATTGGGCCATATTGGG R: CCTGAATACACTCGCAATCC	VIC	(GT) <sub>6</sub>	148-152	4	55,7	0,442
SSR21	F: *GATTGCGAGTGATTTCAGG R: TCCAACATCAAGACTCAGG	FAM	(GT) <sub>7</sub> G(GT) <sub>2</sub>	191-192	2	53	0,333
SSR22**	F: *ATCAGGCCATATTGGGACG R: TGACACGCCACACATGC	FAM	(GA) <sub>6</sub>	213-216	2	55,7	0,375
SSR23**	F: *GCATGTGTGGGCGTGCA R: ACCACACGCACACACACG	VIC	(GT) <sub>5</sub>	109	1	55,7	0,000
SSR25	F: *GTTGTTTCTCCTGTAGCAGGGC R: TAACTAAGATTCGTTGCAAACCTGA	NED	(TC) <sub>20</sub> (TG) <sub>12</sub>	201-247	11	59,5	0,615
SSR27	F: *ATGGAGGTTTATGAGATGGC R: CATATCTCTCCTCCACC	NED	(GA) <sub>12</sub>	213-225	8	55,7	0,514
SSR28	F: *CGAGCCGCCACGATAGAGC R: TAGGTAGGCGACCCAAACCCC	FAM	(GA) <sub>5</sub>	115-117	2	59,5	0,375
SSR30	F: *AAGATCAAAATTAGAAATCAG R: CAGTATTGTGCGCATATGC	PET	(GA) <sub>9</sub>	116-140	3	53	0,198
SSR31	F: *CAACTTGGAGAGAGAGAG R: GAGTCCAACAATCCAACG	NED	(GA) <sub>9</sub>	123-163	3	53	0,416
SSR33**	F: *ATTGTGAACAAAGACTTTGATGG R: CATCAACTACCCCTTATACC	VIC	(GT) <sub>4</sub> TTCAT(TG) <sub>23</sub> C(GT) <sub>7</sub>	183	1	53	0,000
SSR35	F: *TTATTAGGGGCATGAACG R: CCAAAA AGA AGA GAG AGA G	PET	(CT) <sub>18</sub>	161-165	3	53	0,471
SSR36**	F: *TGGGAT TTG AGG TGG CAA GC R: AGCTCT CCC ATG CTC AAA GC	NED	(CT) <sub>12</sub>	184-186	2	57,3	0,244
SSR38	F: *TGACGA GGATGA AGC TCC R: ACCTGT TTG ACC CCT CAC	VIC	(GA) <sub>20</sub>	136-156	10	53	0,752
SSR39	F: *TCCTTC CCA AGC TGC AGC R: GGCTGCAGCAGCTCCTTC	NED	(AG) <sub>10</sub> G(AG) <sub>2</sub> GAG (GA) <sub>5</sub> (AGA) <sub>3</sub>	111-115	3	55,7	0,361

Note: A = numero totale di alleli ritrovati per tutti gli individui analizzati; T<sub>a</sub> = temperatura di appaiamento dei primer; TD = touchdown; PIC = polymorphic information content. <sup>1</sup>M13 tag (CACGACGTTGTAAAACGAC) aggiunto all'estremità 5' del primer senso. \*\* Marcatore monomorfo.

**Tab. 4** – Caratterizzazione di 21 loci microsatellitari in *Pancreatium maritimum*.

Locus	Italia (I)			Spagna (R)			Israele (K)		
	A	$H_o$	$H_e^a$	A	$H_o$	$H_e^a$	A	$H_o$	$H_e^a$
SSR3	2	0,500	0,387	2	0,250	0,226	2	0,313	0,272
SSR7	—	—	— <sup>n.c.</sup>	5	0,063	0,583*	3	0,286	0,571
SSR8	—	—	— <sup>n.c.</sup>	6	0,429	0,719*	—	—	— <sup>n.c.</sup>
SSR11	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>	7	0,933	0,685	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>
SSR13	—	—	— <sup>n.c.</sup>	5	1,000	0,682*	—	—	— <sup>n.c.</sup>
SSR15	5	0,563	0,472	4	0,250	0,573*	4	1,000	0,669*
SSR19	2	1,000	0,516*	2	1,000	0,516*	2	1,000	0,516*
SSR20	3	0,438	0,486	4	0,875	0,621	3	0,500	0,506
SSR21	2	0,938	0,514*	2	0,563	0,417	2	0,313	0,272
SSR22	2	1,000	0,516*	2	1,000	0,516*	2	1,000	0,516*
SSR23	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>
SSR25	6	0,857	0,846	2	0,000	0,226*	7	0,900	0,874
SSR27	3	0,545	0,450	6	0,750	0,601	5	0,467	0,526
SSR28	2	1,000	0,545	2	1,000	0,517*	2	1,000	0,522*
SSR30	2	0,063	0,063 <sup>n.c.</sup>	2	0,375	0,315	2	0,250	0,226
SSR31	2	0,125	0,121	2	0,250	0,226	2	0,200	0,189
SSR33	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>	1	0,000	0,000 <sup>n.c.</sup>
SSR35	—	—	— <sup>n.c.</sup>	3	0,375	0,623	—	—	— <sup>n.c.</sup>
SSR36	—	—	— <sup>n.c.</sup>	2	1,000	0,500*	—	—	— <sup>n.c.</sup>
SSR38	8	0,750	0,726	3	0,500	0,599	4	0,429	0,611
SSR39	3	0,467	0,384	2	0,563	0,417	2	1,000	0,516*

Note: A = numero di alleli;  $H_e$  = eterozigosità attesa;  $H_o$  = eterozigosità osservata.

<sup>a</sup> Deviazione significativa dall' equilibrio di Hardy-Weinberg \* a  $P < 0,01$ ; n.c. = non calcolato.

**Tab. 5** – Risultati dello *screening* dei *primer* in tre popolazioni di *Pancreatium maritimum*.

Marcatore	Frequenza allele più rappresentato	N. totale campioni testati	N. alleli totali	PIC
SSR15	0,58	417	18	0,61
SSR25	0,22	417	25	0,82
SSR27	0,54	417	16	0,64
SSR31	0,47	417	11	0,63
Media	0,45	417	17,5	0,68

**Tab. 6** – Indici di diversità genetica per ogni locus.

Popolazioni	N	Ho	He	Fis
CJ	10	0,72	0,56	-0,12
CS	23	0,41	0,54	0,30
CC	24	0,59	0,63	0,09
F	20	0,62	0,64	0,06
AT	20	0,88	0,53	-0,60
GA	22	0,52	0,46	-0,10
K	16	0,64	0,54	-0,12
P	20	0,50	0,53	0,09
T	19	0,42	0,50	0,24
I	16	0,52	0,45	-0,12
A	22	0,41	0,30	-0,28
Z	11	0,66	0,43	-0,49
L	16	0,66	0,56	-0,16
MB	11	0,45	0,37	-0,14
J	11	0,45	0,42	0
B	23	0,50	0,56	0,22
SA	24	0,35	0,47	0,46
FS	14	0,61	0,54	-0,05
W	24	0,40	0,53	0,31
R	16	0,31	0,39	0,30
S	8	0,44	0,51	0,20
KA	5	0,25	0,42	0,58
SM	19	0,34	0,43	0,28
TM	18	0,67	0,67	0
Media	17,4	0,48	0,47	0,04

**Tab. 7** – Eterozigosità osservata e attesa e indice di *Fis* per ogni popolazione.

Popolazioni	Locus SSR15	Locus SSR25	Locus SSR27	Locus SSR31
CJ	•	•		•
CS	•	•	•	•
CC		•		•
F	•	•	•	•
AT	•	•	•	•
GA	•	•		•
K	•	•		
P		•		•
T	•	•	•	•
I				
A	•	•		
Z		•		•
L		•		
MB		•		
J				
B	•			•
SA	•		•	•
FS	•	•		•
W		•	•	•
R	•	•		
S	•		•	
KA		•		
SM		•	•	
TM		•	•	•

**Tab. 8** – Loci che si discostano significativamente dall'equilibrio di H-W in ciascuna popolazione ( $P < 0,05$ ).

## APPENDICI

**APPENDICE 1** - Protocollo completo per la costruzione della libreria di microsattelliti nucleari.

**LEGEND**




\* **HINT**



**I. DNA extraction and quantification.**

*\*Before beginning the preparation, set the water bath to 60°C.*

- 1) Grind 100 mg of fresh leaf tissue to a fine powder in liquid nitrogen with a mortar and pestle. For algal culture, go directly to the next step.
- 2) Transfer the resulting powder to a new 2-mL tube and add 900 µL of 2× CTAB extraction buffer.
- 3) Mix vigorously and then incubate at 60°C for 30 min in a water bath with gentle agitation.
- 4) Add an equal volume of chloroform–isoamyl alcohol (24:1) and mix vigorously.
- 5) Centrifuge the sample at 7000 g for 5 min.
- 6) Recover the top aqueous layer and transfer into a new tube.
- 7) Repeat steps 4, 5, and 6.

 *If the aqueous phase is not clear, then repeat step 7.*

- 8) Add 70% of cold isopropanol and mix gently by inverting the tube.
- 9) Place the sample at –20°C for 10 min.
- 10) Centrifuge the sample at 10,000 g at 4°C for 8 min and discard the supernatant.
- 11) Rinse with 70% EtOH and centrifuge at 10,000 g at 4°C for 5 min.
- 12) Discard the supernatant.
- 13) Dry the pellet and resuspend in 50 µL of sterile water.
- 14) Add 1 µL of (1 mg/mL) RNase A and mix the sample.
- 15) Incubate the sample for 1 h at 37°C.
- 16) Precipitate the DNA with 0.7 volumes of isopropanol and 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2.
- 17) Place the sample at –20°C for 10 min.

- 18) Centrifuge the sample at 10,000 g at 4°C for 10 min to pellet the DNA.
  - 19) Discard the supernatant.
  - 20) Rinse with 70% EtOH and centrifuge at 10,000 g at 4°C for 5 min.
  - 21) Discard the supernatant.
  - 22) Dry the pellet and resuspend in 50 µL of sterile water.
  - 23) Run 2 µL of DNA with Marker II (AppliChem) on a 0.8% agarose gel containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide.
  - 24) Run at 60 V for approximately 4 h.
  - 25) Visualize the gel using an UV-transilluminator and estimate the concentration of DNA.
- \*Extraction should yield a high molecular weight band of DNA.*

## II. Restriction enzyme digestion.

- 1) To digest genomic DNA with restriction enzymes, mix the following components in a 1.5-mL tube:

Component	Quantity
2 µg genomic DNA	x µL
10× buffer ReAct3 (Invitrogen)	6 µL
<i>Eco</i> RI (10 U/µL) (Invitrogen)	0.5 µL
<i>Mse</i> I (5 U/µL) (Invitrogen)	1 µL
Sterile water	x µL
<b>Total volume</b>	<b>60 µL</b>



*Always add the restriction enzymes last, removing them from -20°C only when needed and immediately return the enzyme to -20°C after use.*

- 2) Incubate the sample at 37°C for 2 h.
- 3) Inactivate the enzymes by heating the sample to 75°C for 15 min.
- 4) Precipitate the DNA with 2 volumes of 100% EtOH and 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2.
- 5) Place the sample at -20°C for 10 min.
- 6) Centrifuge the sample at 10,000 g at 4°C for 10 min to pellet the DNA.
- 7) Discard the supernatant.
- 8) Rinse with 70% EtOH and centrifuge at 10,000 g at 4°C for 5 min.
- 9) Discard the supernatant.



- 10) Repeat steps 8 and 9.
- 11) Dry the pellet and resuspend in 15  $\mu$ L of sterile water.

### III. Size selection, gel extraction, and purification.

- 1) Run the precipitated digestion with a 100-bp DNA ladder (Promega) on a 1% agarose gel containing 0.5  $\mu$ g/mL of ethidium bromide.

- 2) Run at 50 V for approximately 4 h.



*Run until the markers are well separated.*

- 3) Visualize the gel using an UV-transilluminator and cut a slice containing DNA fragments of 250–500 bp in size from the gel with a razor blade (Fig. 1).



*Be sure to use a sterile scalpel and trim away as much agarose as possible.*

- 4) Place the gel slice into a 2-mL tube.
- 5) Add 500  $\mu$ L of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 1 mM EDTA (pH 8.0) to the slice of agarose.
- 6) Close the tube and mix by vortexing vigorously. Incubate for 5 min at 65°C.
- 7) During the incubation period, a special filtration column to elute the contents of the band must be prepared, according to the instructions at the end of protocol (see Filtration column).
- 8) After the incubation, transfer the sample to the filtration column and centrifuge for 5 min.
- 9) Remove the pierced tube and add an equal volume of phenol to the eluate.
- 10) Vortex the mixture for 20 s and centrifuge at 7000 g for 10 min.
- 11) Recover the aqueous phase and transfer it into a new 1.5-mL tube.
- 12) Add an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) to the sample.
- 13) Vortex the mixture for 20 s and centrifuge at 7000 g for 10 min.
- 14) Recover the aqueous phase and transfer it into a new 1.5-mL tube.
- 15) Add an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1).
- 16) Vortex the mixture for 20 s and centrifuge at 7000 g for 10 min.
- 17) Transfer the aqueous phase into a new 1.5-mL tube.
- 18) Add 2 volumes of 100% EtOH and 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2.



*Store at –20°C overnight. Alternatively, you can place the sample at –80°C for 15 min.*

- 19) Centrifuge the sample at 10,000 g at 4°C for 10 min to pellet the DNA.
- 20) Discard the supernatant.

- 21) Rinse with 70% EtOH and centrifuge at 10,000 g for 5 min.
- 22) Discard the supernatant.
- 23) Repeat steps 21 and 22.
- 24) Dry the pellet and resuspend in 15  $\mu$ L of sterile water.

#### IV. Adapter preparation and ligation.

Adap\_*EcoA*: 5'-CTC gTA gAC TgC gTA CC-3'

Adap\_*EcoB*: 5'-AAT Tgg TAC gCA gTC TAC-3'

Adap\_*MseA*: 5'-gAC gAT gAg TCC TgA g-3'

Adap\_*MseB*: 5'-TAC TCA ggA CTC AT-3'

- 1) For the preparation of the *EcoRI*-adapter (5  $\mu$ M), in a 0.2-mL PCR tube, add:

Component	Quantity
Adap_ <i>EcoA</i> , 100 $\mu$ M	2 $\mu$ L
Adap_ <i>EcoB</i> , 100 $\mu$ M	2 $\mu$ L
Sterile water	36 $\mu$ L
<b>Total volume</b>	40 $\mu$ L

- 2) For the preparation of the *MseI*-adapter (50  $\mu$ M), in a 0.2-mL PCR tube, add:

Component	Quantity
Adap_ <i>MseA</i> , 100 $\mu$ M	20 $\mu$ L
Adap_ <i>MseB</i> , 100 $\mu$ M	20 $\mu$ L
<b>Total volume</b>	40 $\mu$ L

- 3) Incubate the two PCR tubes in a thermocycler using the following protocol:

PCR PROGRAM = ADAPTERS		
Step	Temperature	Time
Hold 1	94°C	3 min
Hold 2	70°C	5 s
Hold 3	60°C	5 s
Hold 4	50°C	5 s
Hold 5	40°C	5 s
Hold 6	25°C	5 s
Hold 7	14°C	1 min
Hold 8	4°C	1 min

- 4) To perform the ligation of the adapters to restricted DNA, in a 0.2-mL PCR tube, add:

Component	Quantity
Digested DNA	7.5 µL
5× DNA ligase Buffer (Invitrogen)	5 µL
5 µM <i>Eco</i> RI-adapter	3 µL
50 µM <i>Mse</i> I-adapter	3 µL
T4 ligase (5 U/µL) (Invitrogen)	0.4 µL
Sterile water	6.1 µL
<b>Total volume</b>	<b>25 µL</b>



*Always add T4 ligase last, removing it from -20°C only when needed and immediately return the enzyme to -20°C after use.*

- 5) Incubate the reaction at 24°C for 2 h.

#### V. First enrichment.

- 1) To increase the amount of DNA ligated with the adapters, perform a PCR reaction.

Pre\_*Eco*-0: 5'-gAC TgC gTA CCA ATT C-3'

Pre\_*Mse*-0: 5'-gAT gAg TCC TgA gTA A-3'

In a 0.2-mL tube add:

Component	Quantity
Restricted-ligated DNA	2.5–5 $\mu\text{L}$
10 $\times$ <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (DreamTaq <sup>TM</sup> , Fermentas)	2.5 $\mu\text{L}$
2.5 mM dNTPs (Promega)	2 $\mu\text{L}$
Primer Pre_ <i>Eco</i> -0, 50 $\mu\text{M}$	0.125 $\mu\text{L}$
Primer Pre_ <i>Mse</i> -0, 50 $\mu\text{M}$	0.125 $\mu\text{L}$
5 U/ $\mu\text{L}$ <i>Taq</i> DNA polymerase (DreamTaq, Fermentas)	0.25 $\mu\text{L}$
Sterile water	x $\mu\text{L}$
<b>Total volume</b>	25 $\mu\text{L}$

\*The 10 $\times$  DreamTaq buffer contains 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

Vortex to mix the solution and spin down.

- 2) Incubate in a thermocycler using the following protocol:

PCR PROGRAM = PRE1_ARR			
Step	Temperature	Time	No. of cycles
Extension	72°C	2 min	1
Denaturation	95°C	30 s	25
Annealing	50°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	2 min	1

- 3) Run 4  $\mu\text{L}$  of PCR product with 1  $\mu\text{L}$  of a 100-bp ladder on a 1% agarose gel containing 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ethidium bromide (Fig. 2).



*The smear of fragments should be visible and centered at approximately 500 bp.*

**VI. Preparation of the biotinylated oligo-repeat and hybridization.**

1) In a 0.2-mL PCR tube, add:

Component	Quantity
250 ng PCR product of the first enrichment	x $\mu$ L
500 ng biotinylated oligo-repeat, (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) (e.g., GA <sub>15</sub> -b)	0.5 $\mu$ L
2 $\times$ hybridization buffer	25 $\mu$ L
Sterile water	x $\mu$ L
<b>Total volume</b>	50 $\mu$ L

2) Incubate the reaction in a thermocycler using the following protocol:

PCR PROGRAM = OLIGO-HIB		
Step	Temperature	Time
Denaturation	95°C	5 min
Touchdown	-0.2°C/5 s until the next hold (hybridization)	
Hybridization	82°C  ↪ <i>This step is a function of the <math>T_m</math> of the biotinylated oligo-repeat. In this example, a (GA)<sub>15</sub>-b has been considered.</i>	20 min
Hold	14°C	$\infty$

**VII. Preparation and VETREX Avidin D capture.**

- 1) Place 40  $\mu$ L of VETREX Avidin D into a 1.5-mL tube.
- 2) Centrifuge the sample at 12,000 g for 30 s and discard the supernatant.
- 3) Equilibrate the VETREX Avidin D by washing twice with 2 volumes of 1 $\times$  TBS (500  $\mu$ L for 1 min), centrifuge and discard the supernatant following each wash.

- 4) In a new 1.5-mL tube, mix the following:

Component	Quantity
2× TBS	500 µL
Biotinylated hybridized sample from the VI.2 procedure	50 µL
Sterile water	450 µL
<b>Total volume</b>	1000 µL

- 5) Add this solution to the VETREX Avidin D pellet, gently resuspend, and allow the reaction to bind for 1 h at room temperature with occasional mixing.
- 6) Centrifuge the binding reaction for 1 min at 12,000 g.
- 7) Carefully remove the supernatant without disturbing the VETREX Avidin D pellet.
- \*Retain the supernatant until binding of the biotinylated sample has been verified in step 8.*
- 8) Wash the VETREX Avidin D matrix with 1 mL of 1× TBS to remove any unbound molecules.
- 9) Pellet the matrix by centrifugation for 1 min at 12,000 g and discard the supernatant.
- 10) Repeat steps 8 and 9 two times.
- 11) Wash the VETREX Avidin D pellet with 500 µL of 1× TBS at 50°C.
- 12) Pellet the matrix by centrifugation for 1 min at 12,000 g and discard the supernatant.
- 13) Wash the VETREX Avidin D pellet with 500 µL of 1× TBS at 65°C.
- 14) Pellet the matrix by centrifugation for 1 min at 12,000 g and discard the supernatant.
- 15) Wash the VETREX Avidin D pellet with 500 µL of 0.1× TBS at 65°C.
- 16) Pellet the matrix by centrifugation for 1 min at 12,000 g and discard the supernatant.
- 17) Resuspend the VETREX Avidin D pellet in 250 µL of sterile water at 65°C for 30 min.
- 18) Centrifuge the sample for 1 min at 12,000 g and transfer the aqueous phase into a new 1.5-mL tube.
- 19) Add 2 volumes of 100% EtOH and 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2. Place at -20°C for 20 min.
- 20) Centrifuge the sample at 11,000 g at 4°C for 8 min to precipitate the DNA.
- 21) Discard the supernatant.
- 22) Rinse the sample with 70% EtOH and centrifuge at 10,000 g for 5 min.
- 23) Discard the supernatant.
- 24) Repeat steps 22 and 23.

- 25) Dry the pellet and resuspend in 25  $\mu$ L of sterile water.



*Store the sample at 4°C overnight.*

- 26) To remove any residual VETREX Avidin D matrix, vortex and centrifuge at 12,000 g for 2 min.  
 27) Transfer the aqueous phase into a new 1.5-mL tube.

### VIII. Second enrichment and cloning.

- 1) To increase the selected DNA fragments, perform triplicate PCR reactions. For each PCR reaction, add the following:

Component	Quantity
Enriched-recovered DNA post Avidin D	5 $\mu$ L
10 $\times$ <i>Taq</i> DNA polymerase buffer (DreamTaq, Fermentas)	2.5 $\mu$ L
2.5 mM dNTPs (Promega)	2 $\mu$ L
Primer Pre_ <i>Eco</i> -0, 50 $\mu$ M	0.125 $\mu$ L
Primer Pre_ <i>Mse</i> -0, 50 $\mu$ M	0.125 $\mu$ L
5 U/ $\mu$ L <i>Taq</i> DNA polymerase (DreamTaq, Fermentas)	0.25 $\mu$ L
Sterile water	15 $\mu$ L
<b>Total volume</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>

- 2) Incubate in a thermocycler using the following protocol:

PCR PROGRAM = PRE2_ARR			
Step	Temperature	Time	No. of cycles
Initial denaturation	95°C	30 s	1
Denaturation	95°C	30 s	30
Annealing	50°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	3 min	1

- 3) When the PCR reactions are completed, join all three PCR reactions in a unique tube.

- 4) Purify the PCR product with DNA Enzyme-free Isolation Spin Kit (AppliChem), according to the standard protocol recommended by the manufacturer, and resuspend in 30  $\mu\text{L}$  of sterile water.
- 5) To estimate the concentration of purified product, run 2  $\mu\text{L}$  on 1% agarose gel with Marker II (AppliChem).
- 6) For cloning, follow the protocol supplied using pMosBlue blunt-ended cloning kit (GE Healthcare) or any other comparable cloning kits on the market (e.g., CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas–Thermo Fisher Scientific).
- 7) To calculate the appropriate amount of PCR product (insert) to include in the ligation-cloning reaction, calculate the average of an insert between 250 and 500 bp (i.e., approximately 375 bp).

### IX. Colony screening and sequencing.

- 1) The presence of an appropriate insert can directly be determined using colony PCR.  
In this step, we were able to use a homemade *Taq* polymerase (NAP-*Taq*, De Castro, unpubl. data).
- 2) Pick an individual colony from the plate containing the transformants using a sterile tip, place into a 0.2-mL PCR tube and resuspend in 20  $\mu\text{L}$  of the PCR master mix. Pipet up and down to disperse the pellet.
- 3) Prepare a PCR master mix for the number of colonies analyzed plus one extra sample. For each 20- $\mu\text{L}$  reaction, mix the following reagents:

Component	Quantity
10 $\times$ <i>Taq</i> DNA polymerase buffer	2 $\mu\text{L}$
2.5 mM dNTPs (Promega)	1.8 $\mu\text{L}$
Plasmid forward primer, 50 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{L}$
Plasmid reverse primer, 50 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{L}$
5 U/ $\mu\text{l}$ <i>Taq</i> DNA polymerase (homemade NAP- <i>Taq</i> ) ⇒ <i>Taq</i> made in the authors' laboratory (De Castro, unpubl. data)	0.25 $\mu\text{L}$
Sterile water	15.75 $\mu\text{L}$
<b>Total volume</b>	20 $\mu\text{L}$



- 4) Incubate the reaction in a thermocycler using the following protocol:

<b>PCR PROGRAM = Colony screening</b>			
<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>No. of cycles</b>
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	94°C	30 s	30
Annealing	$T_m$ primers	30 s	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	2 min	1

- 5) On a 1% agarose gel containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide, run 2 µL of PCR product with a 100-bp ladder (Promega) and Marker II (AppliChem).
- 6) Run the sample at 80 V for approximately 30–40 min.
- 7) Visualize the gel using an UV-transilluminator and examine the PCR results.
- 8) Quantify the PCR product concentration and size for subsequent sequencing. Select the fragments larger than 350 bp.

*\*Discard the fragments smaller than 350 bp because if a non-recombinant colony is picked, a sequence of 139 bp would be amplified.*

- 9) Proceed to sequencing, without purification of the PCR products. For each 10-µL sequencing reaction, mix the following reagents:

<b>Component</b>	<b>Quantity</b>
5× Sequencing Buffer, BigDye Terminator v.1.1, v.3.1 (Applied Biosystems)	1.75 µL
Plasmid forward primer, 6.4 µM (Macrogen)	0.5 µL
BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)	0.3–0.4 µL
3–5 ng of positive PCR product	≤0.3 µL
Sterile water	x µL
<b>Total volume</b>	10 µL

Vortex the sample and centrifuge briefly.

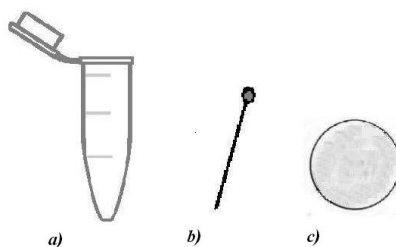
- 10) Incubate the reaction in a thermocycler using the following protocol:

<b>PCR PROGRAM = Sequencing</b>			
<b>Step</b>	<b>Temperature</b>	<b>Time</b>	<b>No. of cycles</b>
Denaturation	96°C	10 s	25
Annealing	50°C	5 s	
Extension	60°C	4 min	

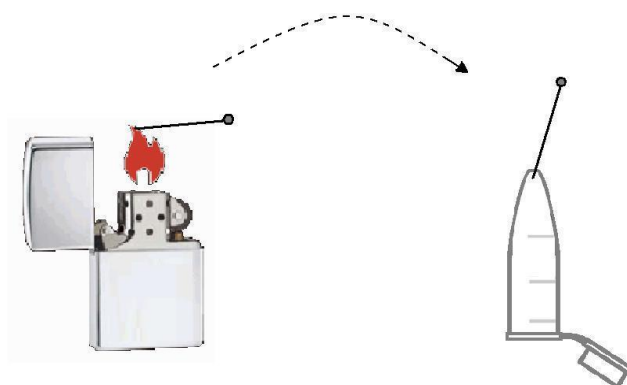
- 11) Perform a precipitation of the sequencing reactions by adding 2 volumes of 100% EtOH and 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2. Place the reaction at -20°C for 10 min.
- 12) Centrifuge the sample at 11,000 g at 4°C for 8 min.
- 13) Discard the supernatant.
- 14) Rinse the sample with 70% EtOH and centrifuge at 11,000 g for 5 min.
- 15) Discard the supernatant.
- 16) Repeat steps 13 and 14.
- 17) Dry the pellet and resuspend in 13 µL of Hi-Di Formamide.
- 18) Denature the sample at 95°C for 3 min.
- 19) Load the samples into a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies) or similar old-generation automated sequencer.
- 20) ... and good luck screening!
- 21) During the screening, discard the sequences without repeating. Perform the sequencing reaction again with the reverse primers on the positive sequences (with repeat).
- 22) Following DNA sequencing, the poly-linker vector and adapter sequences should be removed. Both strands are contiged and edited to ensure the accuracy of the sequencing. The sequences are now available to design primers.
- 23) Following editing, PCR primers are designed from the flanking DNA sequences using handmade methodology or with the free software available on the web.  
(e.g., NCBI/ Primer-BLAST = <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

**APPENDICE 2** – Preparazione della colonnina filtrante per la purificazione da gel.

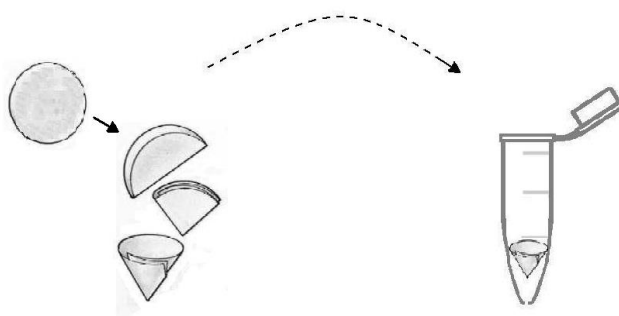
1. For construction of “special” filtration column, the following materials are necessary: (a) a 1.5-mL tube, (b) a sterile needle, and (c) a small piece of blotting paper with diameter of 1.5 cm.



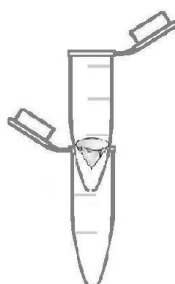
2. Pierce the bottom of a 1.5-mL tube with a hot sterile needle. The hole must have a diameter of approximately 3 mm.



3. Using a small piece of blotting paper, create a small funnel and place it into pierced 1.5-mL tube.



4. Finally, insert the pierced tube into a new 1.5-mL tube.



## BIBLIOGRAFIA

- 
- Abbassy MA, el-Gougary OA, el-Hamady S, Sholom MA (1998) Insecticidal, acaricidal and synergistic effects of soosan, *Pancreatium maritimum* extracts and constituents. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 28: 197-205.
  
  - Abbate G, Alessandrini A, Blasi C, Conti F (2005) An annotated checklist of the Italian vascular flora. Rome:Palombi Editori.
  
  - Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control 19: 716-722.
  
  - Akoègninou A, van der Burg WJ, van der Maesen LJG (2006) Flore Analytique du Bénin. Leiden: Backhuys Publishers.
  
  - Arcangeli G (1896) Sulla struttura e sulla disseminazione dei semi del *Pancreatium maritimum*. Bollettino della Società Botanica Italiana 8: 278-281.
  
  - Bakker FT, Culham A, Gomez-Martinez R, Carvalho J, Compton J, Dawtrey R, Gibby M (2000) Patterns of nucleotide substitution in Angiosperm cpDNA *trnL*<sup>(UAA)</sup>-*trnF*<sup>(GAA)</sup> regions. Molecular Biology and Evolution 17(8): 1146-1155.
  
  - Balestri E, Cinelli F (2004) Germination and early-seedling establishment capacity of *Pancreatium maritimum* L. (Amaryllidaceae) on coastal dunes in the North-Western Mediterranean. Journal of Coastal Research 20: 761-770.

- 
- Baltisberger M, Widmer A (2006) Chromosome numbers of plant species from the Canary Islands. *Botanica Helvetica* 116: 9-30.
  
  - Bastida J, Viladomat F (2002) Alkaloids of *Narcissus*. *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles: The Genus Narcissus* (Hanks G, ed). Taylor and Francis, London, 141-214.
  
  - Battandier JA (1919) *Contributions à la Flore Atlantique*. Paris: Librairie Klincksieck, Lhomme.
  
  - Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (2004) GENETIX, Ver. 4.05.2; logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.  
<http://www.univmontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>.
  
  - Berkov S, Evstatieva L, Popov S (2004) Alkaloids in Bulgarian *Pancreatium maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c: 65-69.
  
  - Biju-Duval B, Dercourt J, Le Pichon X (1976) La genèse de la Méditerranée. *La Recherche* 7: 811-822.
  
  - Birky CW (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11331–11338.

- 
- Björnstad IN (1973) A revision of the genus *Pancratium* L. (Amaryllidaceae) in Africa South of the Sahara. *Norwegian Journal of Botany* 20: 281-291.
  
  - Bohs L, Olmstead RG (1997) Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany* 22: 5-17.
  
  - Borsch T, Hilu KH, Quandt D, Wilde W, Neinhuis C, Barthlott W (2003) Non-coding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* 16:558–576.
  
  - Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.
  
  - Boulos L (2005) *Flora of Egypt*. Cairo: Al Hadara Publishing.
  
  - Burkill HM (1985) *The useful plants of west tropical Africa*, Vol 1. Kew: Royal Botanical Gardens.
  
  - Cardoso MA, Provan J, Powell W, Ferreira PCG, De Oliveira DE (1998) High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam (Leguminosae Caesalpinioideae), *Molecular Ecology* 7: 601-608.

- 
- Carpaneto G M, Gratani L, Marinucci C, Spanò C (1983) Ecologia del Narciso marino (*Pancreatium maritimum*). *Agricoltura e Ambiente* 21: 1-14.
  
  - Corriveau JL, Coleman AW (1998) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 species. *Am. J. Bot.* 75: 1443-1458.
  
  - Crawford Dj, Ruiz E, Stuessy TF, Tepe E, Qevequep A, Gonzalez F, Jensen RJ, Anderson GJ, Bernardello G, Baeza CM, Swenson U, Silva M (2001) Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American Journal of Botany* 88 (12): 2195-2203.
  
  - Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF (1985) The families of monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
  
  - Di Silvestro D, Ardenghi NMG, Parolo G (2010) Il Progetto FOR-MARE, FORMAZione e Ricerca scientifica in aree marine protette: stage di Ecologia marina e Geobotanica applicate. XIX Congresso del Gruppo per l'ecologia di Base "G. Gadio". Italy: Olbia, 21-23 maggio.
  
  - Dobignard D, Chatelain C (2010) Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Genève: Éditions des conservatoire et jardin botaniques.
  
  - Dönmez EO, İlk S (2008) Pollen morphology of Turkish Amaryllidaceae, Ixioliriaceae and Iridaceae. *Grana* 47: 15-38.



- 
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
  
  - Edwards K J, Barker A, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* 20: 758-760.
  
  - Eisikowitch D, Galil L (1971) Effect of wind on the pollination of *Pancreatium maritimum* L. (Amaryllidaceae) by hawkmoths (Lepidoptera: Sphingidae). *Journal of Animal Ecology* 40: 673-678.
  
  - El-Hadidy A, El-Ghani M, Amer W, Hassan R (2011) Systematic revision of the genus *Pancreatium* L. (Amaryllidaceae) in Egypt with a new addition. *Notulae Scientia Biologicae* 3: 24-38.
  
  - El-Hadidy A, El-Ghani M, Amer W, Hassan R (2012) Morphological and molecular differentiation between egyptian species of *Pancreatium* L.(Amaryllidaceae). *Acta biologica cracoviensia. Series Botanica* 54 (1): 53-64.
  
  - Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
  
  - Farris JS, Kluge AG, Eckardt MJ (1970) A numerical approach to phylogenetic systematics. *Systematic Zoology* 19: 172-191.

- 
- Fay MF, Chase MW (1996) Resurrection of Themidaceae for the Brodiaea alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45:441-451.
  
  - Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
  - Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
  
  - Feinbrun-Dothan N (1986) *Flora palestina*, Vol. 4. Jerusalem: The Israel Academy of Science and Humanity.
  
  - Fischer D, Bachmann K (1998) Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24: 796-802.
  
  - Foggi B, Grigioni A, Luzzi P (2001) La flora vascolare dell'isola di Capraia (Arcipelago Toscano): aggiornamenti, aspetti fitogeografici e di conservazione. *Parlatorea* 5: 5-53.
  
  - Fossi Innamorati T (1991) La flora vascolare dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). *Webbia* 45: 137-185.
  
  - Freshwater DW, Rueness J (1994) Phylogenetic relationships of some European Gelidium (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33 (3): 187-194.

- Geburk T (1997) Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. *Biodivers. Conserv.* 6: 1639-1654.
- Glenn TC, Schable NA (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395: 202-222.
- Grassi F, Cazzaniga E, Minuto L, Peccenini S, Barberis G, Basso B (2005) Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Panocratium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea. *Biodiversity and Conservation* 14: 2159-2169.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Guo S, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Accessed September 2011.
- Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A, Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27: 500-507.

- 
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD (1991) Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE (Eds). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, USA, pp. 75-86.
  
  - Hansen A, Sunding P (1993) *Flora of Macaronesia*. Checklist of vascular plants, 4th revised edition. Oslo: Sommerfeltia.
  
  - Hansen H, Escobar LK, Gilbert LE, Jansen RK. (2007) Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. *Am. J. Bot.* 94: 42-46.
  
  - Hartl DL. 1988. *A primer of population genetics*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
  
  - Hepper FN (1968) *Flora of West Tropical Africa*, 2 ed., Vol. 3(1). London: Crown Agents.
  
  - Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755. <http://mrbayes.sourceforge.net>. Accessed September 2011.
  
  - Hutchinson J (1934) *Families of Flowering Plants*. Vol. 2. Monocotyledons, 1st Ed. MacMillan, London.

- 
- Hutchinson J (1959) Families of flowering plants. vol 2. Monocotyledons, 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford
  
  - Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1998) Botanica Sistemática: un approccio filogenetico. Piccin, Padova.
  
  - Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
  
  - Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
  
  - Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM (1994) Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 88-92.
  
  - Keren A, Evenari M (1974) Some ecological aspects of distribution and germination of *Pancregium maritimum* L. *Israel Journal of Botany* 23: 202-215.
  
  - King J, Thorogood D, Edwards KJ, Armstead IP, Roberts L, Skot K, Hanley Z, King IP (2008) Development of a genomic microsatellite library in perennial ryegrass ( *Lolium perenne* ) and its use in trait mapping. *Annals of Botany* 101: 845-853.

- 
- Leraut JA (1997) Liste systematique et synonymique des Lepidopteres de France, Belgique et Corse, Paris.
  
  - Linnaeus C (1753) Species plantarum, tome I. Holmiae, Stockholm.
  
  - Lojacono-Pojero M (1908) Flora Sicula o descrizione delle piante spontanee o indigenate in Sicilia. Vol. 3 (Monocotyledones, Cryptogamae). Palermo: Scuola Tipografica Boccone del Povero.
  
  - Mabberley DJ (2008) Mabberley's Plant-book. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
  
  - Maire R (1936) Bulletin de la Société d'Historie Naturelle de l'Afrique du Nord, tome 27. Alger: Imprimerie F. Montégut et A. Degüili.
  
  - Maire R (1938) Bulletin de la Société d'Historie Naturelle de l'Afrique du Nord, tome 29. Alger: Imprimerie F. Montégut et A. Degüili.
  
  - Mau B, Newton MA, Larget B (1999) Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. Biometrics 55: 1-12.
  
  - Medrano M, Guitián P, Guitián J (1999) Breeding system and temporal variation in fecundity of *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae). Flora 194: 13-19.

- 
- Medrano M, Guitián P, Guitián J (2000) Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Pancreatium maritimum* (Amaryllidaceae): nonuniform pollination, resource limitation, or architectural effects? *American Journal of Botany* 87: 493-501.
  
  - Meerow AW (1995) Towards a phylogeny of the Amaryllidaceae. *Monocotyledons: systematics and evolution*, vol.1 (Rudall PJ, Cribb PJ, Cultler DF, Humphries KJ, eds) Royal Botanic Gardens, Kew, 169-179.
  
  - Meerow AW, Snijman DA (1998) Amaryllidaceae. In: K. Kubitzki, ed., *The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. 3. Flowering Plants. Monocotyledons. Liliales (except Orchidaceae)*: 83-110, Springer-Verlag, Berlin.
  
  - Meerow AW, Fay MF, Guy CL, Li QB, Zaman FQ, Chase MW (1999) Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 86: 1325-1345.
  
  - Meerow AW, Guy CL, Li QB, Yang SL (2000) Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Systematic Botany* 25(4): 708-726.
  
  - Meerow AW, Snijman DA (2006) The neverending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae. *Aliso* 22: 355-366.

- 
- Meerow AW, Francisco-Ortega J, Kuhn DN, Schnell RJ (2006) Phylogenetic relationships and biogeography within the Eurasian clade of Amaryllidaceae based on plastid *ndhF* and nrDNA ITS sequences: lineage sorting in a reticulate area? *Systematic Botany* 31: 42-60.
  
  - Mill RR (1984) *Pancratium* L. In: Davis PH, ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 8. Edinburgh: Edinburgh University Press 380-381.
  
  - Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200.
  
  - Morton JK (1965) The experimental taxonomy of the West African species of *Pancratium*. *Kew Bulletin* 19: 337-347.
  
  - Muller-Doblies D, Muller-Doblies U (1978) Studies on tribal systematics of Amaryllidaceae 1. The systematic position of *Lapiedra* Lag. *Lagscalia* 8(1):13-23.
  
  - Nicastro L (2003-2004) Osservazioni morfo-anatomiche ed ecologiche su alcune specie appartenenti al genere *Pancratium* L. nell'area mediterranea. Unpublished Thesis, University of the Study of Palermo.
  
  - Nikopoulos D, Nikopoulou D, Papadopoulou K, Alexopoulos A (2006) *Pancratium maritimum* ecosystems in Greece. International Conference, Sustainable Management and Development of Mountainous and Island Areas, Naxos, Greece, September 29, 30 and October 1, 2006. *Proceedings of the Conference A*: 333-340.



- 
- Nordal I (1982) Flora of Tropical East Africa. Kew: Royal Botanical Gardens.
  
  - Nylander JAA, Olsson U, Alström P, Sanmartín I (2008) Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: *Turdus*). *Systematic Biology* 57: 257-268.
  
  - Olmstead RG, Sweere JA (1994) Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467-481.
  - Olmstead RG, Reeves PA (1995) Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 176-193.
  
  - Olmstead RG, Reeves PA, Yen AC (1998) Patterns of sequence evolution and implications for parsimony analysis of chloroplast DNA. *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing* (eds, PS Soltis, DE Soltis, and JJ Doyle), Kluwer, Boston 164-187.
  
  - Oyewole SO (1988) Caryotype variation in *Pancratium hirtum* A. Chev. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75: 218-225.
  
  - Oyewole SO, Mustapha OT (1990) Karyotype differentiation in *Pancratium hirtum* A. Chev. complex (Amaryllidaceae) in Nigeria. *Revista de Biología Tropical* 38: 467-471.
  
  - Palmer JD (1985) Chloroplast DNA and molecular phylogeny. *Bioessays* 2: 263-267.

- 
- Pax F (1887) Amaryllidaceae, p.97-124. In: Engler A and Prantl K (Eds.). Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 1st Ed. vol. 2 (5). Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
  
  - Pax F, Hoffmann K (1930) Amaryllidaceae, p.391-430. In: Engler A and Prantl K (Eds.). Ibid., 2nd Ed., 15°. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig and Berlin.
  
  - Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Note 6:288-295.
  
  - Perez-Mellado V, Ortega F, Martin-Garcia S, Perera A, Cortazar G (2000) Pollen load and transport by the insular lizard *Podarcis linfordi* (Squamata, Lacertidae) in coastal islets of Menorca (Balearic Islands, Spain). Israel Journal of Zoology 46(3): 193-200.
  
  - Pettit GR, Pettit GR, Groszek G, Backhaus R, Doubek D, Barr R, Meerow A (1995) Antineoplastic agents, 301. An investigation of the Amaryllidaceae genus *Hymenocallis*. Journal of Natural Products 58:756-759.
  
  - Popov SV, Shcherba IG, Ilyina LB, Nevesskaya LA, Paramonova NP, Khondkarian SO, Magyar I (2006) Late Miocene to Pliocene palaeogeography of the Paratethys and its relation to the Mediterranean. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 238: 91-106.

- 
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256. Available at: <http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html>. Accessed September 2011.
  
  - Quandt D, Muller KF, Stech M, Hilu KW, Frey W, Frahm JP, Borsch T (2004) Molecular evolution of the chloroplast trnL-F region in land plants. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden*, 98: 13-37.
  
  - Quandt D, Stech M (2004) Molecular Evolution of the *trnT*<sup>UGU</sup>-*trnF*<sup>GAA</sup> Region in Bryophytes. *Plant Biology* 6: 545-554.
  
  - Ricciardi M, Nazzaro R, Caputo G, De Natale A, Vallariello G (2004) La flora dell'isola di Ischia (Golfo di Napoli). *Webbia* 59: 1-113.
  
  - Rodríguez F, Oliver JF, Marín A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485-501.
  
  - Ronquist F (1996) DIVA version 1.1. Computer program and manual available by anonymous FTP from Uppsala University. Available at: <http://ftp.uu.se/or//ftp.systbot.uu.se/>.
  
  - Ronquist F (1997) Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 195-203.

- 
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572--1574. <http://mrbayes.sourceforge.net>. Accessed September 2011.
  
  - Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C (2002) Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. *Journal of the Virtual Explorer* 8: 107-130.
  
  - Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C (2004) The Mesozoic and Cenozoic motion of Adria (central Mediterranean): a review of constraints and limitations. *Geodinamica Acta* 17: 125-139.
  
  - Rousset F (2008) GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
  
  - Sanaa A., Fadhel NB (2010) Genetic diversity in mainland and island populations of the endangered *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) in Tunisia. *Scientia Horticulturae* 125: 740-747.
  
  - Sanaa A, Boulila A, Boussaid M, Ben Fadhel N (2013) Alginic acid and derivatives, new polymers from the endangered *Pancratium maritimum* L. *Industrial Crops and Products*.44: 290-293.
  
  - Sanger FS, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.

- 
- Sanmartín I (2003) Dispersal vs. vicariance in the Mediterranean: historical biogeography of the Palearctic Pachydeminae (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Journal of Biogeography* 30: 1883-1897.
  
  - San Miguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature Genetics* 20: 43-45.
  
  - Santos-Gally R, Vargas P, Arroyo J (2011) Insights into Neogene Mediterranean biogeography based on phylogenetic relationships of mountain and low land lineages of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Journal of Biogeography*.
  
  - Sato D (1938) Karyotype alteration and phylogeny. IV Karyotype in Amaryllidaceae with special reference to the SATchromosome. *Cytologia* 9: 203-242.
  
  - Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
  
  - Sickenberger E (1901) Contributions à la Flore d' Égypte. *Mémoires de l'Institut d'Égypte* 4(2): 167-332.
  
  - Squirrel J, Hollingsworth PM, Woodehead M, Russel J, Lowe J, Gibby M, Powell W (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12: 1339-1348.

- 
- Sur-Altiner D, Gurkan E, Mutlu G, Tuzlaci E, Ang O (1999) The antifungal activity of *Pancreatium maritimum*. *Fitoterapia* 70:187-189.
  
  - Swofford DL (1998) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
  
  - Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105-1109.
  
  - Täckholm V, Drar M (1954) Flora of Egypt, vol. 3. Bulletin of the Faculty of Science. University of Cairo 30. Cairo: Cairo University Press.
  
  - Täckholm V (1974) Student's Flora of Egypt, 2nd ed. Cairo: Cairo University Press.
  
  - Techen N, Arias RES, Glynn NC, Pan Z, Khan IA, and Scheffler BE (2010) Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Molecular Ecology Resources* 10: 508-515.
  
  - Thompson HJ (1914) Flowering Plants of the Riviera. A descriptive account of 1800 of the more interesting species. Longmans, Green & Co., London.
  
  - Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- 
- Thompson JD (2010) Plant evolution in the Mediterranean. Oxford: Oxford University Press.
  
  - Toth G, Gspri Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 10, 967-981.
  
  - Traub HP (1936) Genera of the Amaryllidaceae. American Plant Life Society, La Jolla.
  
  - Valsecchi F (1982) Le piante endemiche della Sardegna. *Bollettino della Società Sarda delle Scienze Naturali* 21: 427-441.
  
  - Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new techniques for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
  
  - Walters SM, Brandy A, Brickell CD, Cullen J, Green PS, Lewis J, Matthews VA, Webb DA, Yeo PF, Alexander JCM (1986) The European garden flora, Vol.1 Cambridge: Cambridge University Press.
  
  - Wang ML, Barkley NA, Jenkins TM (2009) Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics*. Global Science Books.

- 
- Werker E, Fahns A (1975) Seed anatomy of *Panocratium* species from three different habitats. *Botanical Gazetin* 136: 396-403.
  
  - Wier BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
  
  - Willis JC (1988) A dictionary of the flowering plants and ferns. Cambridge: Cambridge University Press.
  
  - Wolfe KH, Lee WH, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary gratly among plant mitochondria, chloroplast and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of the Science of the USA* 84: 9054-9058.
  
  - Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 115: 323-354.
  
  - Yu Y, Harris AJ, He XJ (2010) S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 56: 848-850. <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/SDIVA/index.html>. Accessed September 2011.
  
  - Yu Y, Harris AJ, He XJ (2011) RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 2.0 beta. <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP/index.html>. Accessed September 2011.



- 
- Zahreddine H, Clubbe C, Baalbaki R, Ghalayini A, Talhouk SN (2004) Status of native species in threatened Mediterranean habitats: the case of *Pancratium maritimum* L. (sea daffodil) in Lebanon. *Biodiversity and Conservation* 120: 11-18.
  
  - Zalapa, JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany* 99: 193-208.
  
  - Zaman MA, Nessa L (1974) Meiotic behaviour in  $2n = 44$  and karyotype analysis in  $2n = 55$  chromosome *Pancratium verecundum* L. (Amaryllidaceae). *Caryologia* 27: 395-402.
  
  - Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
  
  - Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennett MD (2005) First Nuclear DNA Amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany* 96: 229-244.
  
  - Zurawski G, Clegg MT, Brown AHD (1984) The nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics* 106: 735-749.