

**Università della Calabria**  
**Facoltà di Scienze M.F.N. - Dipartimento di Ecologia**

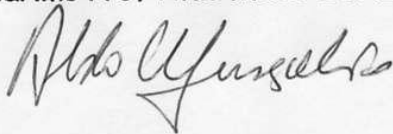
---

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale**  
**XVIII ciclo - settore disciplinare BIO/01**

**Filogenesi e processi speciativi in orchidee**  
**Mediterranee non nettarifere del genere *Serapias* L.**  
**(Orchidaceae).**

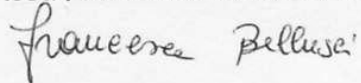
**Docente tutor**

**Chiar.mo Prof Aldo MUSACCHIO**



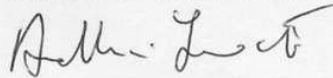
**Candidata**

**dr.ssa Francesca BELLUSCI**



**Coordinatore**

**Chiar.ma Prof.ssa Anna Maria INNOCENTI**



---

*Anno Accademico 2005-2006*

---

## INDICE

Premessa	1
Le Orchidaceae	3
Caratteri generali e morfologia	3
Biologia della riproduzione	7
Problematiche sistematico-evolutive delle Orchidaceae	10
Problematiche sistematico-evolutive delle orchidee Mediterranee	12
Il genere <i>Serapias</i>	13
Problematiche sistematico-evolutive del genere <i>Serapias</i>	16
Obiettivi della tesi	17
Materiali e metodi	19
<u>Specie studiate</u>	19
<u>Indagini filogenetiche</u>	24
<u>Processi demografici</u>	32
<u>Amplified Fragment Length Polymorphisms</u>	38
Analisi dei dati	41
Risultati	48
Discussione	72
Considerazioni conclusive	86
Letteratura citata	88

## Premessa

La famiglia delle Orchidaceae comprende un elevatissimo numero di specie caratterizzate da una comune struttura florale e da una biologia riproduttiva molto specializzata. Per questo motivo, le orchidee sono state a lungo considerate il migliore esempio di speciazione basata sull'isolamento florale *sensu* Grant, un concetto di base della biologia evolutiva delle piante (Grant, 1949). Questo concetto prevede che i meccanismi di impollinazione possano agire da barriere di isolamento riproduttivo favorendo la divergenza di stirpi e, in ultima analisi, la formazione di nuova specie.

È possibile, infatti, che specie vegetali possano essere interfertili e rimanere riproduttivamente isolate a causa di isolamento meccanico (gli impollinatori visitano i fiori di due specie ma non riescono a trasferire il polline) o etologico (fedeltà degli impollinatori che visitano una sola specie). A sostegno di quest'ipotesi, fu osservato che i generi di piante impollinati da insetti mostravano maggiore diversità di quelli con sistemi di impollinazione non specializzati suggerendo un legame tra impollinazione specializzata e velocità di speciazione (Dodd *et al.*, 1999).

Più di recente, studi approfonditi sulla biologia della riproduzione hanno evidenziato che l'impollinazione generalista, affidata cioè a più specie di insetti, è molto diffusa tra le piante, e non di meno nelle orchidee dove è spesso associata a strategie in base alle quali la pianta, pur non offrendo ricompensa, attira gli insetti con vari inganni. Questa consapevolezza ha rinnovato l'interesse per la storia evolutiva tra e nei vari gruppi di orchidee in relazione alla selezione dei tratti floreali, alla divergenza tra le popolazioni e alla natura delle barriere riproduttive tra le specie. In particolare, è sorto un nuovo interesse per le barriere post zigotiche che nelle orchidee sono state tipicamente ignorate. L'introduzione di metodi molecolari ha consentito di ricostruire la storia

filogenetica e filogeografica di molti gruppi vegetali e di esplorare i processi di speciazione sia a livello di fenomeni quali la poliploidia e l'ibridazione, sia a livello di popolazione attraverso lo studio dei flussi genici e/o della selezione locale.

Nel corso del Dottorato di ricerca svolto presso il Laboratorio di Biosistemica Vegetale del Dipartimento di Ecologia dell'Università della Calabria, sono state condotte indagini biosistematiche sulle orchidee non nettarifere del genere *Serapias*. Il proposito era di pervenire ad una definizione delle relazioni filogenetiche intrageneriche così come di esplorare i meccanismi di speciazione, esaminando la biologia riproduttiva delle principali specie e le caratteristiche della struttura genetica di popolazioni e specie. Nel complesso, studi biosistematici sul genere *Serapias* potrebbero fornire utili informazioni per la descrizione di processi speciativi nell'ambito del Mediterraneo.

## Le Orchidaceae

### Caratteri generali e morfologia

Le orchidee sono piante erbacee perenni sia terrestri che epifite. Le prime hanno come organi sotterranei con funzione di riserva o un rizoma ramificato (*Epipactis* e *Cephalanthera*) o un tubero radicale (*Orchis*, *Ophrys*, *Gymnadenia*), che si rinnova annualmente a partire dall'ascella di una scaglia (foglia) radicale, e da cui nasce il germoglio dell'anno successivo. Le orchidee epifite, largamente diffuse ai Tropici, vivono fissate agli alberi delle foreste e presentano un fusto con foglie isolate o ridotte a scaglie, e, spesso, anche lunghe radici aeree pendenti, avvolte nel velamen che costituisce un involucro assorbente attorno alla radice, con apice verde, fotosintetizzante. Le orchidee scandenti hanno radici ipogee ma fusti volubili che aderiscono a substrati diversi ed emettono radici aeree simili a quelle delle specie epifite. Le orchidee parassite, infine, sono organismi eterotrofi, totalmente o parzialmente sforniti di clorofilla che vivono in funzione delle sostanze organiche presenti nel terreno o delle specie fungine con le quali sono in simbiosi.

L'organo epigeo delle orchidee è lo scapo o caule che si presenta normalmente eretto, privo di ramificazioni, cilindrico, di colore verde, talvolta con sfumature rosse/bruno, generalmente glabro, non supera mai gli 80 cm di altezza. Tra gli individui della stessa specie le dimensioni dello scapo variano in funzione delle caratteristiche edafiche del sito dove vegetano e anche in relazione all'età della pianta.

Sullo scapo vi sono foglie alterne, intere, sessili, con lembo a nervature parallele, con una lamina che può essere di tipo lineare, lineare-lanceolata, oblungho-lanceolata, ovato-ellittica, ovata.

Il caule, alla sua estremità, presenta un'infiorescenza a spiga o a racemo costituita da un numero variabile di fiori spesso con disposizione acropeta.

I fiori ermafroditi sono posti all'ascella di una brattea le cui dimensioni, forma e colore sono caratteri a valenza sistematica utilizzati per la classificazione delle specie.

I fiori sono zigomorfi, ovvero possono essere attraversati da un solo piano di simmetria che li divide nel senso della lunghezza in due parti speculari che nel corso del loro sviluppo subiscono una torsione di 180° (resupinazione) a livello dell'ovario o del peduncolo. Questo evento determina un cambiamento della disposizione dei pezzi fiorali perciò le parti posteriori divengono anteriori (Strasburger, 1982).

Il perigonio è costituito da un verticillo esterno di 3 sepali liberi e da un secondo verticillo, interno, anch'esso trimero, formato da 2 petali liberi posti lateralmente ed un terzo, anteriore, detto labello. Quest'ultimo può essere intero o bi o tri-lobato, o diviso in due parti una basale e l'altra apicale - ipochilo ed epichilo - da una strozzatura intermedia come nel genere *Serapias* (Fig. 1), o prolungato alla base in uno sperone che può contenere nettare, come nei generi *Orchis* e *Dactylorhiza* (Grünanger, 2001). In altri casi, come in varie specie del genere *Ophrys*, il labello ha un'appendice apicale e due gibbosità più o meno prominenti, collocate in posizione basale e sulla sua superficie mostra un'area priva di peli variabile per forma e colorazione (specchio).

L'androceo è formato da 2 verticilli, ciascuno originariamente di 3 stami, che hanno subito varie riduzioni ed hanno portato il numero complessivo di stami a 2-5, di cui sono fertili soltanto 2 del verticillo interno o 1 di quello esterno, mentre gli altri sono presenti in qualità di staminodi. Ogni stame produce una notevole quantità di granuli di polline che si agglutinano in masse o pollinii, uno per ciascuna loggia dell'antera, a volte racchiusi da una guaina (teca) ed uniti ad un corpo adesivo, il retinacolo, mediante un piccolo filamento, la caudicola.

L'ovario, infero e sessile, è formato da 3 carpelli fusi in un ovario uniloculare. Lo stimma si presenta, di solito, come una cavità sotto l'antera avente, superiormente, una piccola prominente detta rostello

con forma e dimensioni variabili. Questa struttura, che deriva da uno dei tre lobi stigmatici, spesso può presentare una o due sottili membrane (borsicula) che ricoprono i retinacoli proteggendoli.

Nelle orchidee gli stami fertili sono fusi con il gineceo a formare il ginostemio.

La formula florale, nel complesso, è:  $P_{3+3}, [A_2 \text{ oppure } 1, G_{(3)}]$ .

Il frutto è una capsula che si apre longitudinalmente con 3 o 6 setti da cui fuoriescono, a maturazione, numerosissimi e piccolissimi semi.

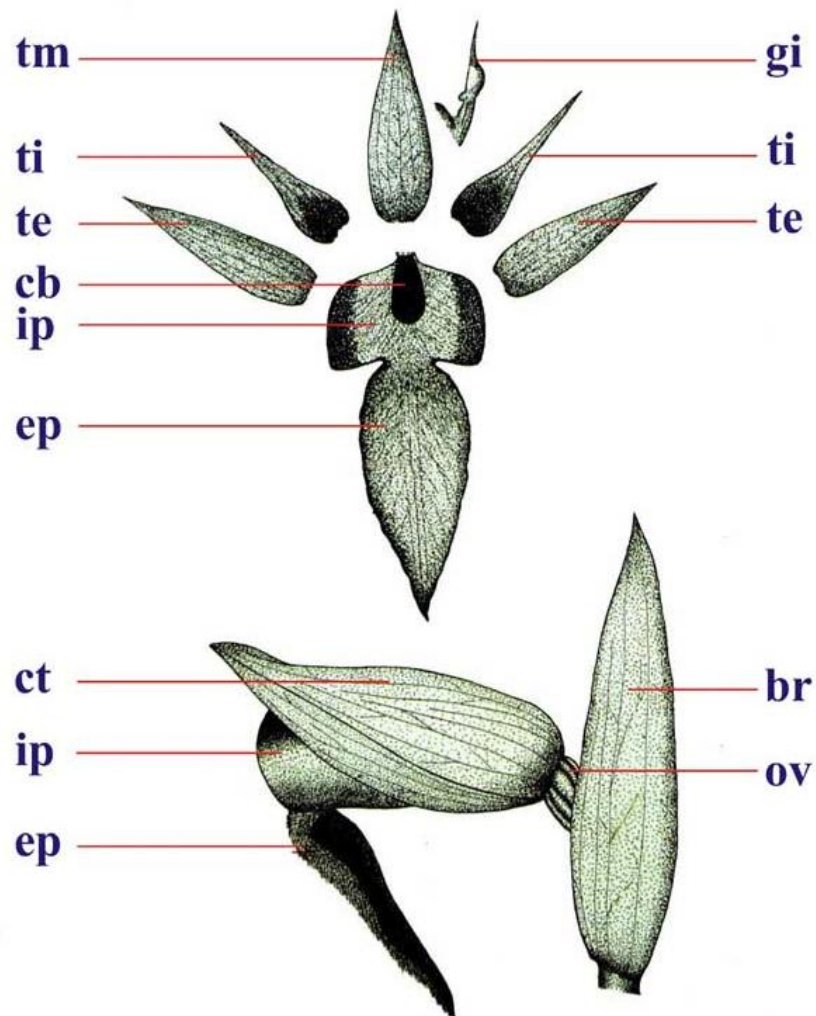


Figura 1. Morfologia tipica della struttura fiorale delle specie del genere *Serapias*.

**br:** brattea; **cb:** callo basale; **ct:** casco tepalico; **ep:** epichilo; **gi:** ginostemio;

**ip:** ipochilo; **ov:** ovario; **te:** tepalo esterno; **ti:** tepalo interno; **tm:** tepalo mediano.



## Biologia della riproduzione

Le orchidee possono riprodursi sia per via agamica che per via sessuata. La prima, seppur poco frequente, si realizza quando la pianta va incontro ad una moltiplicazione vegetativa ad opera di propaguli, bulbilli o gemme avventizie.

La riproduzione sessuata è di solita incrociata, anche se non mancano esempi di autogamia, come nei generi *Neottia* e *Cephalanthera*. In condizioni ambientali particolarmente sfavorevoli si può verificare la cleistogamia, ossia l'autofecondazione in assenza di antesi.

Darwin dedicò un intero libro alla biologia dell'impollinazione delle orchidee, perché fu colpito dalla spettacolare diversità fiorale, relativa al loro odore, colore e forma del labello, e dai relativi adattamenti nei confronti degli impollinatori.

Un aspetto affascinante della biologia delle orchidee è la loro capacità di realizzare l'impollinazione senza offrire agli insetti che la attuano una ricompensa nutritiva, rappresentata di solito dal nettare e/o dal polline. Questo tipo di strategia fu scoperto da Sprengel nel 1793 (Sprengel, 1793) ed è indicata come impollinazione ingannevole, senza ricompensa o, ricorrendo ad un inglesismo, decettiva. Un punto importante è che, sebbene tale sistema sia comune anche ad altri gruppi di angiosperme, nelle orchidee è particolarmente frequente ed è stato valutato che circa un terzo di esse lo ha adottato. In particolare, una strategia esclusiva delle orchidee è quella basata sull'inganno sessuale, che si presume sia presente in 400 specie, quali quelle del genere *Ophrys* nel Mediterraneo o del genere *Crypostylis* in Australia. In questi casi, le piante attraggono gli insetti imitando i segnali sessuali (forme, colori e odori) della femmina della specie impollinatrice, evidenziando la precisa interazione tra piante ed animali. Di contro, altre specie ingannevoli hanno sistemi di impollinazione generalisti, in cui più tipi di insetti possono attuare l'impollinazione.

Altre caratteristiche importanti della biologia riproduttiva delle orchidee riguardano gli ovuli e i semi. Gli ovuli sono numerosissimi (da alcune migliaia a milioni per ovario) e maturano solo dopo che l'impollinazione ha avuto luogo. Il frutto derivato dall'ovario è una capsula che contiene semi minuti, dispersi di solito per via anemofila, senza tessuto di riserva (endosperma) e per questo motivo la loro germinazione dipende spesso dall'instaurarsi di simbiosi fungine più o meno specifiche. I funghi che instaurano un rapporto di simbiosi con l'apparato radicale delle orchidee, appartengono alla classe dei *Basidiomycetes*, ed in particolare, al genere *Rhizoctonia* (Fig. 2) (Zelmer, 1996). Tale associazione, nota come micorrizza (mycos = fungo; rhizon = radice), avviene già nelle primissime fasi della germinazione con la penetrazione del fungo simbionte nelle cellule basali del sospensore dell'embrione, che è poco sviluppato e differenziato, per cui è definito proembrione.

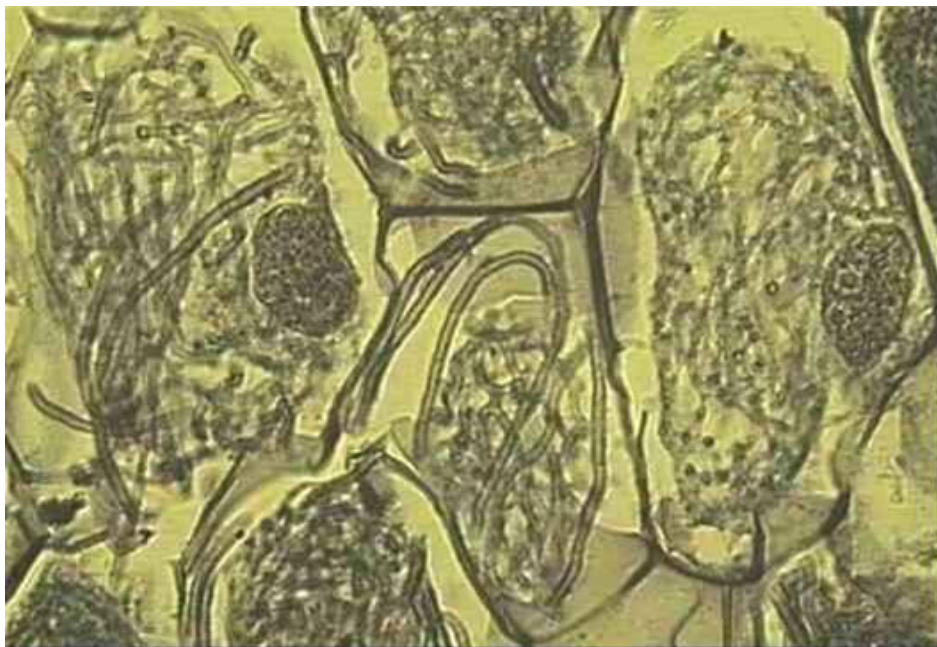


Figura 2. Simbiosi tra funghi della specie *Rhizoctonia repens* e l'apparato radicale di un'orchidea.

Dal suo accrescimento si genera un protocormo che nella zona centrale conserva una densa fascia di rizine, mentre, nella zona apicale sviluppa l'abbozzo del futuro germoglio. La presenza del micelio all'interno delle cellule, permette la degradazione di polisaccaridi complessi presenti nell'humus del suolo, in zuccheri semplici più facili da assorbire ed utilizzare dalle cellule dell'ospite.

Lo sviluppo del micelio all'interno delle radici si protrae sino ad un valore soglia, oltre il quale la quantità eccedente è distrutta da un principio fungicida prodotto dall'orchidea stessa. Di solito, questo micotrofismo è necessario solo fino alla formazione di un piccolo tubero, ma alcune orchidee che non sviluppano strutture fotosintetiche (*Limodorum* e *Neottia*) rimangono dipendenti dall'infezione fungina per tutta la vita (Del Prete & Tosi, 1988).

### **Problematiche sistematico-evolutive delle Orchidaceae**

La famiglia delle Orchidaceae comprende circa 30000 specie diffuse maggiormente nelle regioni tropicali, ma presenti anche in tutte le flore di quelle temperate. Nella regione Mediterranea sono ben rappresentate ed hanno dato luogo ad interessanti casi di diversificazione. In Italia, attualmente, sono riconosciuti trenta generi (Pignatti, 1982), con numero variabile di specie, distribuite in modo regolare su tutto il territorio.

Per le loro molteplici e complicate strategie adattative le orchidee sono considerate le più evolute tra le Spermatophyta. Nel complesso, però, la famiglia evidenzia un'uniformità sul piano dell'organizzazione florale, ed è considerata, per questo, un gruppo omogeneo dal punto di vista evolutivo. Tuttavia, la mancanza di reperti fossili certi e l'enorme variabilità all'interno dei gruppi rendono difficile la sicura definizione del percorso evolutivo realizzatosi nella famiglia. Inoltre, sebbene le relazioni filetiche tra i numerosi gruppi siano state delineate solo in parte, la delimitazione di alcuni di essi resta poco chiara.

La classificazione delle Orchidaceae nei ranghi tassonomici più alti si basa, tradizionalmente, sulle caratteristiche del ginostemio, struttura derivante dalla fusione di stami e carpelli, e tipica della famiglia. In base al numero delle antere, che varia da 3 ad 1, la famiglia è stata suddivisa in tre gruppi, *Polyandrae*, *Diandrae* e *Monandrae*, solitamente riconosciuti come sottofamiglie.

Più di recente, Dressler (1993) ha distinto nelle Orchidaceae le seguenti 5 sottofamiglie:

- *Apostasioideae*, i cui due generi hanno tre antere fertili o in alternativa due antere fertili ed un filamento staminoide;
- *Cypripedioideae*, costituita da cinque generi con due antere fertili (diandrous), uno staminoide a forma di schermo;
- *Orchidoideae*, con le orchidee aventi una sola antera fertile (monandrous);

- *Spiranthoideae*, comprendente le orchidee con un'unica antera eretta e acrotonica;
- *Epidendroideae*, che includono tutte le altre orchidee con un'unica antera.

Gli studi molecolari (Cameron *et al.*, 1999, Chase *et al.*, 2003) hanno confermato l'origine monofiletica della famiglia delle Orchidaceae e la posizione ancestrale delle *Apostasioideae*.

Da un punto di vista strettamente evolutivo, invece, rimane ancora irrisolto l'enigma su quale sia la strategia di impollinazione ancestrale. Infatti, tra le orchidee più primitive, le *Apostasioideae* hanno una strategia d'impollinazione basata sulla ricompensa rappresentata dal polline, mentre le *Vanilloideae* e le *Cypripedioideae* sono orchidee decettive (Van der Cingel, 2001). Per tale motivo, non è possibile dire con certezza quale di queste strategie sia quella ancestrale, anche se rimane un punto fermo il fatto che la decezione si è evoluta in molte specie, più volte in maniera indipendente, nei maggiori cladi di orchidee (Van der Pijl & Dodson, 1966).

**Problematiche sistematico-evolutive delle orchidee Mediterranee.**

I rappresentanti delle Orchidaceae presenti nella regione Mediterranea appartengono alla sottofamiglia delle Orchidoideae e sono in prevalenza di origine euro-asiatica. Sono geofite perenni, adattate alle aridità estive tipiche del clima mediterraneo, fioriscono precocemente (in ogni caso in primavera) e molti generi (*Orchis*, *Dactylorhiza*) includono numerose specie con scarse differenze morfologiche, a causa probabilmente della loro recente origine. Di conseguenza, tra tali entità esiste ancora un certo livello di flusso genico che contribuisce a mescolare i caratteri morfologici e/o molecolari, rendendo difficile la delucidazione delle relazioni evolutive tra i taxa, come accade in seguito a fenomeni di ibridazione e introgressione.

In questo contesto, le ricerche molecolari finora prodotte hanno contribuito a migliorare la difficile ed insoddisfacente trattazione sistematico-evolutiva delle orchidee mediterranee (Bateman, 2001; Bateman *et al.*, 2003), ma molto deve ancora essere fatto per comprendere su quali meccanismi si basa la loro speciazione (Van der Pijl & Dodson, 1966; Delforge, 1994; Tremblay *et al.*, 2005). Analisi filogenetiche basate sul polimorfismo delle sequenze dell'ITS hanno solo in parte chiarito le relazioni tra le specie, i generi e le tribù mediterranee (Pridgeon *et al.*, 1997; Aceto *et al.*, 1999; Bateman *et al.*, 2003). In particolare, l'integrazione di dati molecolari e cariologici ha contribuito a definire meglio la sistematica del genere *Orchis* riclassificato in tre distinti generi, *Orchis*, *Anacamptis* e *Neotinea* (Pridgeon *et al.*, 1997). Nello stesso tempo, le relazioni tra le specie di generi quali *Serapias*, *Dactylorhiza* ed *Epipactis* sono rimaste in gran parte irrisolte, stimolando ulteriori indagini basate sull'uso di sequenze plastidiali non codificanti e di marcatori molecolari altamente variabili, quali allozimi (Bateman, 2001), AFLP (Hèdren *et al.*, 2001) e PCR-RFLP (Squirrel *et al.*, 2002).

## Il genere *Serapias*

*Serapias* L. è un genere a diffusione prevalentemente Mediterranea presente dalle Azzorre e dalle Canarie al Caucaso, ad est, ed alle isole Britanniche a nord. Il genere, di probabile origine orientale (Grünanger, 2001), ha un nome che fu scelto per la somiglianza del fiore con “Serapide”, la divinità egizia della fertilità.

Ha un apparato ipogeo costituito da un caratteristico bulbo-tubero (Fig. 3) da cui si diparte lo scapo generalmente di colore verde talvolta maculato nella zona inferiore come in *Serapias cordigera*.

I fiori presenti in numero e grandezza variabili alla sommità dello scapo, hanno brattee con lo stesso colore e le stesse nervature scure dei sepali. Questi ultimi sono lanceolati e con margini coalescenti che nascondono i due petali. Il labello è rivolto verso il basso, diviso in ipochilo ed epichilo e presenta due (o una in *S. lingua*) callosità alla base. I sepali, i petali e i lobi laterali dell’ipochilo formano un condotto tubulare.

Il ginostemio è riflesso in avanti ed è munito di un lungo ed evidente becco acuminato (Delforge, 1994; Grünanger, 2001).

Al genere appartengono specie con corredo cromosomico generalmente diploide  $2n=36$  - fa eccezione *S. lingua*  $2n=72$  (D’Emerico *et al.*, 2000) -, che si riproducono per via sessuata. Solo per *S. parviflora* s’ipotizza un’autogamia facoltativa, ma questa non è stata ancora accertata.

La strategia d’impollinazione adottata da *Serapias* è particolarmente interessante poiché tale genere non produce nettare ma attrae gli



Figura 3. Bulbo-tubero e scapo tipici del genere *Serapias*.

insetti offrendo loro come ricompensa un rifugio per la notte (Dafni *et al.*, 1981), un riparo durante le giornate fredde e piovose, un luogo dove effettuare la termoregolazione (Fig. 4) dal momento che la temperatura all'interno della struttura fiorale è in media più elevata di 1-3°C rispetto alla temperatura esterna (Van der Cingel, 1995). Gli insetti entrando all'interno del tubo fiorale, seguendo il callo presente alla base del labello, rimuovono l'intero pollinario trasportandolo poi sullo stamma del successivo fiore visitato (Dafni *et al.*, 1981). Le differenze nella forma, diametro e profondità del tubo fiorale potrebbero rappresentare una barriera riproduttiva prezigotica se viste come ostacolo al prelevamento dei pollinari (Baumann & Künkele, 1989).

Impollinatori abituali del genere *Serapias* sono le api solitarie dei generi *Eucera*, *Andrena*, *Osmia*, e *Tetralonia* (Dafni *et al.*, 1981) *Ceratina*, *Megachile*, *Rhodanthinium* e *Sphecodes* (Felicioli *et al.*, 1998); più di recente pollinari del genere *Serapias* sono stati ritrovati inaspettatamente anche su *Xylocopa iris* (Widmer *et al.*, 2000), insetto di dimensioni maggiori rispetto agli altri impollinatori.





Figura 4. Insetti impollinatori che trovano rifugio in fiori del genere *Serapias*.

**Problematiche sistematico-evolutive del genere *Serapias***

Le difficoltà incontrate dagli autori nella trattazione tassonomica e nella comprensione delle relazioni evolutive tra le specie di *Serapias* sono analoghe a quelle che rendono difficile la trattazione di altri generi di orchidee Mediterranee.

Infatti, il numero di specie per il genere *Serapias* è controverso poiché la loro distinzione si basa, soprattutto, su caratteri fiorali quantitativi molto variabili nelle popolazioni e nelle specie. In particolare, i caratteri più utilizzati sono l'altezza della pianta, il numero e il colore dei fiori o di parti di essi, la forma, il colore e le dimensioni dell'epichilo e/o dell'ipochilo. Pochi e poco informativi sono i caratteri quantitativi quali la presenza di un callo alla base del labello o il colore dei pollinari.

Pignatti (1982) e Grünanger (2001) riportano per la flora italiana 6 specie, ma il secondo autore ritiene che alcuni taxa siano così affini da essere inclusi in un unico gruppo, quello di *S. vomeracea/S.orientalis*. Tutin (1980) descrive per la flora Europea 5 specie e 2 entità; Nelson (1968), Gözl & Reinhard (1980) e Buttler (1986) reputano, invece, che le specie siano 9-10; più recentemente Delforge (1994) suddivide le entità esaminate in 3 gruppi (*S. vomeracea*, *S. lingua* e *S. parviflora*), e a ciascuno di essi attribuisce, rispettivamente, 18, 5 e 3 specie.

## Obiettivi della ricerca

Le ricerche condotte nel corso del Dottorato e descritte in questa tesi hanno perseguito come principali obiettivi sia l'analisi molecolare filogenetica del genere *Serapias* che lo studio di processi demografici e/o microspeciati.

Lo studio delle relazioni filogenetiche su base molecolare è stato condotto su un numero di specie adeguatamente rappresentativo del genere *Serapias*, sequenziando varie regioni non codificanti del DNA plastidiale. Questa scelta metodologica è stata dettata dall'osservazione dell'insufficiente variabilità molecolare riscontrata da altri autori nelle sequenze nucleari più comunemente utilizzate per tali scopi (Gielly & Taberlet, 1994).

Per esplorare i meccanismi di speciazione, sono stati esaminati aspetti della biologia della riproduzione e sono state condotte analisi con marcatori molecolari altamente variabili per la valutazione della struttura genetica di popolazioni di specie affini.

Per quanto riguarda il primo tipo di indagini, è stato testato il sistema di ricombinazione e l'efficacia ed il tipo di barriere riproduttive esistenti tra le principali specie di *Serapias*. In particolare è stata testata l'esistenza di autogamia spontanea, la fitness riproduttiva in incroci intraspecifici ed interspecifici, la percentuale di semi con embrioni e la loro vitalità.

In parallelo, sono stati utilizzati come marcatori i microsatelliti nucleari, in precedenza sviluppati per *S. vomeracea* (Pellegrino *et al.*, 2001), per determinare la struttura genetica di popolazioni di specie affini e per inferire sui processi microspeciati in relazione alla particolare strategia di impollinazione e/o alla influenza di processi demografici stocastici, quali il drift genetico e fenomeni di colli di bottiglia.

Infine, sono stati testati su alcune delle specie del genere in esame, marcatori AFLP ritenuti, attualmente, tra i più variabili e che potrebbero

essere utilizzati in future indagini sia a livello filogenetico che a livello di processi popolazionistici.

## Materiali e metodi

### Specie esaminate

Per le indagini filogenetiche sono state esaminate 14 specie, alcune delle quali rappresentate da più accessioni. Il campionamento è stato eseguito, grazie anche al contributo di colleghi ed appassionati di orchidee, durante il periodo di fioritura del genere in modo da poter identificare con certezza le specie. Nel complesso, i campioni esaminati rispecchiano in modo adeguato l'areale di distribuzione di ciascuna specie (Delforge, 1994). Le specie, i siti di prelievo ed il numero delle popolazioni campionate sono schematizzati nella tabella 1.

Per ogni sito di prelievo sono state annotate le caratteristiche ecologiche (altitudine, bioma, caratteristiche litologiche), la presenza di specie simpatriche e le dimensioni della popolazione considerata, che variavano da una decina e molte centinaia di individui. In funzione di tali dimensioni, sono stati campionati o tutti o al più 25 individui. Le piante sono state scelte in modo casuale, purché distanti tra loro almeno 5 m.

In aggiunta, sono stati raccolti campioni da una popolazione italiana di *Ophrys bertolonii* e da una di *O. incubacea*, da utilizzare come "outgroup", in quanto appartenenti ad un genere filogeneticamente molto affine a *Serapias* (Bateman *et al.*, 2003).

Per le indagini condotte mediante microsatelliti sono state campionate, invece, popolazioni italiane e greche dei taxa attribuiti al gruppo di *S. vomeracea* (*S. vomeracea* ssp. *vomeracea*, ssp. *laxiflora*, ssp. *orientalis*), mentre per le indagini relative ai marcatori AFLP è stato impiegato lo stesso campionamento di sei delle specie usate anche in ambito filogenetico (*S. parviflora*, *S. lingua*, *S. vomeracea*, *S. politisii*, *S. cordigera*, *S. apulica*).

Per ciascuno degli individui campionati sono state prelevate le foglie basali, opportunamente conservate in gel di silice o congelate a  $- 80^{\circ}\text{C}$  sino al momento dell'utilizzo.

Gli esperimenti di biologia della riproduzione hanno riguardato, invece, piante appartenenti a popolazioni calabresi, campane e pugliesi di *S. vomeracea*, *S. cordigera*, *S. parviflora*, *S. politisii* e *S. lingua*. Riconosciute le specie, sono state prelevate, per ciascuna, circa ventidue piante (Tab. 2) con un certo numero di fiori in preantesi; in seguito sono state poste in vaso e trasferite in un'area allestita in precedenza in modo da evitare il contatto con qualsiasi potenziale insetto impollinatore (Fig. 5). Per *S. politisii* sono state prelevate solo 12 piante a causa delle dimensioni molto ridotte delle popolazioni pugliesi, uniche rappresentanti della specie in Italia.

Tabella 1. Provenienza geografica e numero delle popolazioni delle specie esaminate per le indagini molecolari.

Specie	Provenienza geografica	Regione	n. pop
<i>Ophrys bertolonii</i> MORETTI	Italia	Calabria	1
<i>O. incubacea</i> BIANCA	Italia	Calabria	1
<i>Serapias vomeracea</i> ssp. <i>vomeracea</i> (N.L. BURMAN) BRIQUET	Italia	Piemonte, Lombardia, Liguria, Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Marche, Lazio, Campania, Calabria, Sicilia	28
	Grecia	Zante, Corfù, Chios, Creta, Peloponneso	8
	Francia	Provenza	3
	Turchia		2
	Cipro	Akrotiri, Mandria, Kedaes	3
<i>S. vomeracea</i> ssp. <i>orientalis</i> GREUTER	Italia	Puglia, Sicilia	3
<i>S. vomeracea</i> ssp. <i>laxiflora</i> (SOÓ) GÖLZ & REINHARD	Italia	Calabria, Sicilia	3
	Grecia	Corfù	1
<i>S. apulica</i> (BAUMANN & KÜNKELE) DELFORGE	Italia	Puglia	3
<i>S. levantina</i> BAUMANN & KÜNKELE	Israele		2
<i>S. nurrica</i> CORRIAS	Italia	Sardegna	2
<i>S. perez chiscanoi</i> ACEDO	Spagna	Extremadura	3
<i>S. neglecta</i> DE NOTARIS	Italia	Liguria	1
	Francia	Provenza	3
<i>S. parviflora</i> PARLATORE	Italia	Puglia, Calabria, Campania, Sicilia, Sardegna	7
	Grecia	Corfù	2
	Francia	Provenza	1
	Spagna	Extremadura	1
	Portogallo	Algarve	1
<i>S. cordigera</i> L.	Italia	Campania, Calabria, Puglia, Sardegna	7
	Grecia	Zante, Peloponneso	2
<i>S. politisii</i> RENZ	Italia	Puglia	3
	Grecia	Corfù	3
<i>S. lingua</i> L.	Italia	Puglia, Calabria, Sardegna	7
	Grecia	Corfù	1
	Francia	Provenza	1
	Spagna	Andalusia - Extremadura	2
<i>S. olbia</i> VERGUIN	Francia	Provenza	3
<i>S. gregaria</i> GODFERY	Francia	Provenza	3
<i>S. strictiflora</i> WELWITSCH EX VEIGA	Spagna	Andalusia	2
	Portogallo	Evora	1
<i>S. stenopetala</i> MAIRE & STEPHENSON	Portogallo	Algarve	3

Tabella 2. Numero delle piante campionate per gli incroci inter e intraspecifici, dei fiori mediamente presenti su di esse e loro provenienza geografica.

	provenienza geografica	n° di piante	n° medio di fiori per ciascuna pianta
<i>S. vomeracea</i>	Calabria, Campania	22	5
<i>S. cordigera</i>	Calabria, Campania, Puglia	22	4
<i>S. parviflora</i>	Calabria, Campania, Puglia	22	5
<i>S. politisii</i>	Puglia	12	4
<i>S. lingua</i>	Calabria, Campania	22	4





Figura 5. Aerea allestita presso l'Orto Botanico dell'Università Federico II di Napoli al fine di proteggere le piante utilizzate per gli incroci dagli insetti impollinatori.

## Indagini filogenetiche

### *Il DNA plastidiale nelle indagini filogenetiche*

Il DNA plastidiale è la maggiore fonte del polimorfismo intergenerico e/o interspecifico in ambito vegetale in analisi tassonomiche e filogenetiche, comparabile, forse, solo alle regioni del DNA ribosomale nucleare (Baldwin *et al.*, 1995; Alvarez & Wendel, 2003). Troppo spesso il genoma plastidiale è stato considerato conservativo nelle sequenze in differenti specie vegetali (Vendramin *et al.*, 1996) e con un tasso di mutazione nettamente minore rispetto al genoma nucleare; ma più di recente si è rivalutata la validità dell'uso di questo tipo di marcatori per studi filogenetici poiché essi esprimono un alto potere risolutivo anche dove falliscono le sequenze nucleari (Gielly & Taberlet, 1994).

Sono oltre 21 le regioni codificanti e non, in cui è stato costatato un alto polimorfismo a livello intergenerico e/o interspecifico (Shaw *et al.*, 2005) e per ciascuna sono noti altrettante coppie di primer da utilizzare nelle reazioni di amplificazione.

In questo studio filogenetico, la scelta dei frammenti di amplificazione non è stata semplice per la mancanza di informazioni dettagliate sul tasso di mutazione e sui modi di evoluzione delle regioni non codificanti del cpDNA. Per questo motivo, la scelta è ricaduta su regioni che in studi precedenti si sono rivelate polimorfiche in generi affini a quello studiato.

### *Estrazione del DNA*

Il DNA totale è estratto a partire da 100mg di materiale fogliare secondo una modificazione del protocollo di Doyle (1991). Il tessuto vegetale è frantumato meccanicamente in azoto liquido e risospeso in CTAB 2X (Tris-HCl 100mM pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, bromuro di esadeciltrimetilammonio 2%), un tampone di lisi i cui componenti riescono ad inibire le attività DNAasiche. Dopo aver aggiunto  $\beta$ -mercaptoetanololo, un antiossidante la cui funzione è quella di inibire l'azione delle perossidasi e delle polifenolo ossidasi, il tessuto frantumato è sottoposto a lisi in un bagno termostatico, alla temperatura di 60°C, per 30'.

Il campione è quindi incubato su ghiaccio per alcuni minuti al fine di consentire la precipitazione delle proteine polari e centrifugato a 10000 rpm, per 5' a 4°C.

In seguito sono rimossi pareti cellulari, membrane e altri contaminanti proteici, mediante centrifugazioni seriali a 6000 rpm per 10' a 12°C previa aggiunta al campione di un ugual volume di cloroformio-isoamilico (24:1).

Il DNA è precipitato mediante l'aggiunta alla sola fase acquosa di 0,7 volumi di isopropanolo ed incubazione a -80°C per 1 h oppure a -20°C over-night. Segue una centrifugazione a 13000 rpm per 30' a 4°C.

Il pellet è sottoposto a due lavaggi in etanolo al 70%, asciugato e risospeso in 0.2 ml di TE 1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM), pH 7.6 o in acqua distillata sterilizzata.

Il DNA estratto, di cui si vuole stimare la concentrazione, è sottoposto a corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8% in tampone TBE 1X (Tris base 100mM, acido borico 100mM, EDTA 2mM) alla presenza di bromuro d'etidio (10mg/ml) e di un marcatore di peso molecolare noto (Marker II) realizzato dalla digestione enzimatica del fago  $\lambda$  con l'endonucleasi di restrizione *Hind* III.

### *Amplificazione delle regioni plastidiali*

La PCR o reazione a catena della polimerasi è un metodo rapido per ottenere, in vitro, un elevato numero di copie di sequenze note di acidi nucleici mediante l'uso di una specifica coppia di primer. Ogni reazione di questo tipo è costituita dalle seguenti fasi:

- *denaturazione* al calore (~92°C) della doppia elica di DNA con allontanamento delle proteine associate al genoma e conseguente separazione dei due filamenti;
- abbassamento della temperatura e appaiamento (*annealing*) di coppie di oligonucleotidi (primer) che hanno una sequenza complementare ai loro siti di legame alle estremità 3' di ciascun filamento. Ciascun primer (forward e reverse), che di solito ha una lunghezza compresa tra 18 e 28 bp ed ha un contenuto di GC compreso tra il 50% ed il 60%, non deve presentare sequenze parzialmente omologhe tra loro per evitare la formazione di dimeri o strutture secondarie dell'oligonucleotide;
- *estensione* dei primer e creazione di un nuovo filamento per opera di una DNA polimerasi. La polimerasi più comunemente utilizzata è la *Taq* polimerasi, un enzima che lavora bene alla temperatura di estensione (72°C) e non si denatura nelle prime fasi della reazione. Questa polimerasi, che in passato si estraeva dal *Thermophilus aquaticus* ed oggi è prodotta da batteri geneticamente modificati, manca, però, dell'attività esonucleasica 3'-5'.

Cicli ripetuti di sintesi e denaturazione danno come risultato un incremento esponenziale del numero di frammenti replicati.

I primer universali disegnati da Taberlet *et al.*, (1991) hanno amplificato lo spaziatore interposto tra il gene del tRNA per la Leucina [tRNA-Leu (UAA)] e quello del tRNA per la Fenilalanina [tRNA-Phe (GAA)] - (*trnL-trnF*).

I primer utilizzati da Hamilton (1999) hanno amplificato lo spaziatore interposto tra il gene del tRNA per la Serina [tRNA-Ser (GCU)] e quello del tRNA per la Glicina [tRNA-Gly (UCC)] - (*trnS-trnG*), mentre quelli

disegnati da Oxelman & Berglund (1997) hanno amplificato l'introne dell'*rps16*.

I primer universali studiati da Weising & Gardner (1999), disegnati per rilevare variabilità di regioni microsatellitari hanno amplificato l'introne dell'*AtpF*.

La maggior parte di questi primer sono stati costruiti sulle sequenze ormai note di esoni plastidiali di *Nicotiana tabacum* (Shinozaki *et al.*, 1986), *Marchantia polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986) ed *Oryza sativa* (Hiratsuka *et al.*, 1989) in virtù del fatto che le sequenze degli esoni, così come l'ordine dei geni, sono, generalmente, altamente conservati.

Di seguito sono riportate le sequenze delle quattro coppie di primer utilizzate:

<i>trnL</i>	5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3'	}	<i>trnL-F</i>
<i>trnF</i>	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'		
<i>trnS</i>	5'-GCCGCTTTAGTCCACTCAGC-3'	}	<i>trnS-G</i>
<i>trnG</i>	5'-GAACGAATCACACTTTTACCAC-3'		
<i>rps16 F</i>	5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3'	}	<i>rps16</i>
<i>rps16 R</i>	5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'		
<i>ccmp4 F</i>	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3'	}	<i>AtpF</i>
<i>ccmp4 R</i>	5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'		

I quattro frammenti sono stati amplificati in un termociclatore PTC 100 MJ Research e per ciascuno è stato elaborato uno specifico programma di amplificazione ( Tab. 3).

Per ogni reazione sono stati necessari 10 ng di DNA stampo a cui è stata aggiunta una miscela costituita da tampone 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTPs 200µM, primer (Forward e Reverse) 0,25µM, *Taq* polimerasi 2.5 U/µl.

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio 2% in tampone TBE 1X e bromuro d'etidio (10mg/ml) unitamente ad un 100 bp low ladder Sigma-Aldrich al fine di ottenere una prima stima informativa della loro lunghezza.

In seguito nucleotidi, primers e polimerasi in eccesso sono stati allontanati dal prodotto di PCR utilizzando le colonnine con resina a scambio ionico o prelevando la banda direttamente dal gel d'agarosio.

La concentrazione dei campioni purificati è stata stimata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% a cui è stato unito un marker avente peso molecolare noto (Marker II).

Tabella 3. Programmi di amplificazione utilizzati per ciascuno dei quattro frammenti plastidiali.

<i>trnL-trnF</i>			
denaturazione iniziale	95°C		1'
30 cicli	denat	95°C	1'
	annealing	50°C	1'
	ext	72°C	45''+3'' ogni ciclo
estensione finale	72°C		10'
<i>trnS-trnG</i>			
denaturazione iniziale	94°C		5'
30 cicli	denat	94°C	30''
	annealing	55°C	1'
	ext	72°C	1'45''
estensione finale	72°C		10'
<i>rps 16</i>			
denat iniziale	95°C		5'
35 cicli	denat	95°C	30''
	annealing	55°C	30''
	ext	72°C	1'42''
estensione finale	72°C		10'
<i>atpF</i>			
denaturazione iniziale	94°C		3'
35 cicli	denat	94°C	30''
	annealing	55°C	1'
	ext	72°C	1'
estensione finale	72°C		7'

### Sequenziamento automatico

Le quattro regioni non codificanti del genoma plastidiale sono state sequenziate in numerosi individui rappresentativi delle quattordici specie del genere *Serapias* e delle due specie del genere *Ophrys* secondo il metodo enzimatico introdotto da Sanger *et al.* (1977).

Ogni reazione di sequenza ha un volume finale pari a 20 µl, e contiene:

- ◆ 1-2 ng di amplificato per ogni 100 bp;
- ◆ 6.4 pmol di primer (forward o reverse);
- ◆ 8µl di ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit;
- ◆ acqua bidistillata necessaria per portare a volume.

Ogni frammento è stato sequenziato in ciascun individuo alternativamente con entrambi i primer, usando un kit di reazione con 4 nucleotidi di terminazione (detti dideozinucleotidi - ddNTPs) aventi l'estremità 3' modificata - Fig. 6 - e marcati

ciascuno da un fluorocromo con specifiche proprietà spettrali. L'AmpliTaq™ DNA polimerasi in esso presente ha una mutazione puntiforme nel sito attivo che non consente discriminazione tra i ddNTPs, ed un'altra mutazione nel dominio amino terminale che elimina l'attività nucleasica 5'→3'. Ogni qual volta i ddNTP sono incorporati dalla polimerasi nella molecola nascente del DNA, s'interrompe la sintesi del nuovo

filamento che porterà alla sua estremità un fluoroforo. Alla fine della reazione di sequenza, si avrà una miscela composta da un numero di molecole di diversa lunghezza pari al numero di nucleotidi che formano il tratto del DNA da analizzare.

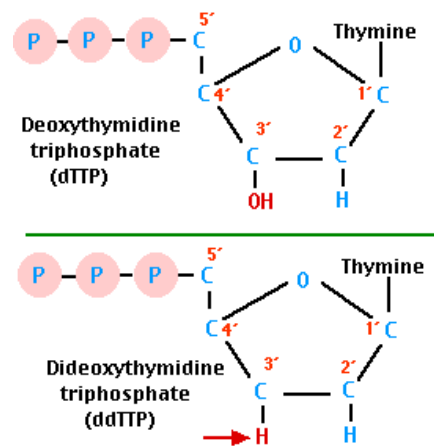


Figura 6. Modificazione chimica di un ddNTP all'estremità 3'.



Le reazioni di sequenza condotte in un termociclatore Perkin Elmer 9600 (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) prevedono un programma di 25 cicli ognuno dei quali composto dai seguenti step:

- ◆ 95°C per 10 secondi;
- ◆ 50°C per 5 secondi;
- ◆ 60°C per 4 minuti.

I terminatori in eccesso sono allontanati aggiungendo ad ogni reazione, in rapporto al suo volume finale, 1/10 di acetato di sodio (3M, pH 4.6) e il doppio di etanolo assoluto.

Dopo 30' a - 80°C, il campione è centrifugato per mezz'ora a 13000 rpm, lavato per due volte con etanolo al 70%, asciugato sottovuoto; poi sarà risospeso in 30µl di formammide e denaturato a 94°C per 2'.

Il campione caricato in un sequenziatore automatico Applied Biosystems (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer,) migrerà lungo il capillare elettroforetico e la fluorescenza emessa, sarà letta da una camera CCD (charge-coupled device) ad altissima risoluzione (50 µm/pixel).

## Processi demografici

### *Biologia della riproduzione*

Gli esperimenti di biologia della riproduzione sono stati condotti in aree protette dall'azione di insetti impollinatori, allestite presso l'Orto Botanico dell'Università Federico II di Napoli ed il laboratorio di Biosistemica Vegetale dell'Università della Calabria. Nel complesso, le specie esaminate sono state: *S. vomeracea*, *S. cordigera*, *S. parviflora*, *S. politisii* e *S. lingua*.

In tutte queste specie è stata verificata l'esistenza o meno di autogamia spontanea. Per tale scopo, non meno di dieci fiori per ciascuna specie sono stati lasciati in condizioni naturali e per essi è stata osservata la formazione spontanea di frutti. Inoltre, due dei fiori in preantesi sono stati prelevati da ciascuna specie e sono stati osservati ad uno stereomicroscopio per rilevarne l'eventuale presenza di masse polliniche sullo stigma.

Incroci manuali intra-specifici sono stati attuati in *S. vomeracea* e *S. cordigera* per valutare i livelli di fitness riproduttiva determinati dai diversi eventi di ricombinazione, cioè autogamia indotta (usando polline dello stesso fiore), geitonogamia (polline di altro fiore della stessa pianta) ed allogamia (polline di piante diverse ma appartenenti alla stessa specie). La fitness è stata valutata attraverso la percentuale di frutti prodotti, di semi contenenti embrioni e di semi germinanti.

Per valutare l'efficacia ed il tipo di barriera riproduttiva tra le specie, sono stati eseguiti incroci manuali tra molte (14) delle coppie possibili per le cinque specie esaminate. Per non sottoporre le piante a stress energetico, sono stati utilizzati non più dei 2/3 dei loro fiori. Per più piante di ciascuna coppia di specie, sono stati prescelti fiori dai quali prelevare i pollinari da deporre sullo stimma di fiori dell'altra specie i quali, a loro volta, erano già stati privati dei loro pollinari. In tal modo, ogni specie ha potuto fungere da specie "paterna" (donatrice di polline)

e da specie “materna” (ricevente il polline). Purtroppo, in *S.politisii* è stato possibile solo il prelievo dei pollinari da deporre sulle altre specie, ma non ne ha potuto ricevere poiché per due primavere successive (2005 e 2006) il suo periodo di fioritura ha anticipato di molto quello delle restanti specie. Per marcare i differenti incroci sono stati legati al pedicello fiorale fili di cotone colorati.

Anche in questo caso la fitness riproduttiva è stata valutata come percentuale di frutti prodotti, di semi con embrione e di semi germinanti. Le piante e i fiori trattati sono stati controllati dopo alcune settimane per verificare la formazione o meno di capsule, che a maturità sono state rimosse e conservata in gel di silice.

Come in molti altri generi di orchidee, anche i semi di *Serapias* sono minuti e trasparenti, per cui è possibile osservarne l’embrione senza ricorrere a colorazioni. Pertanto, parte dei semi di ciascuna capsula è stata posta su vetrini portaoggetti, ed osservata ad un ingrandimento 20X. La percentuale dei semi con embrione è stata valutata in almeno 500 semi per capsula (Fig. 7). Tale osservazione ha permesso, al contempo, di selezionare i vetrini in cui erano presenti, in maniera esclusiva, semi embrionati e di conservarli a 4°C per i successivi esperimenti di germinazione asimbiotica.



Figura 7. Semi di *Serapias* con e senza embrione visualizzati al microscopio ottico.

### *Germinazione asimbiotica in vitro*

I semi ottenuti dagli incroci inter e intraspecifici, sono stati, in seguito, sottoposti a germinazione asimbiotica in vitro per testarne l'effettiva vitalità.

A tal fine è stato preparato un terreno di coltura denominato BM<sub>1</sub> seguendo il protocollo già testato da Van Waese & Debergh (1986) su numerose orchidee europee. Ad un volume d'acqua pari all'80% di quello finale, si aggiungono in proporzioni differenti una serie di composti organici (caseina idrolisato, L-glutammina, saccarosio) ed inorganici (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub> EDTA, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) sotto forma di polveri o in soluzioni di 1mg/ml (CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O e NaMoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O). Si corregge il pH della soluzione con NaOH 1N fino ad un valore di 6.3±0.1, poi si aggiungono agar e carbone attivo per dare al terreno di coltura maggiore consistenza e somiglianza con i terreni naturali.

La miscela è portata ad ebollizione per permettere all'agar di sciogliersi mentre il carbone attivo, poiché è insolubile, rimane in sospensione. Si sterilizza in autoclave la soluzione a 120°C per 20' ad 1 atmosfera.

Nel frattempo si prepara una soluzione vitamina 1000X che non può essere autoclavata perché i suoi componenti sono fortemente termolabili, ma può essere ugualmente sterilizzata perché filtrata attraverso una membrana in acetato di cellulosa esente da tensioattivi ed avente una porosità di 0,2 µm.

Il terreno sterilizzato ma non ancora polimerizzato è completato dall'aggiunta della soluzione vitaminica, poi è ripartito in capsule Petri, anch'esse sterili, opportunamente sigillate con del parafilm dopo la polimerizzazione del mezzo in esse contenuto.

Tutti i processi fin qui descritti devono svolgersi sotto una cappa a flusso laminare per non interrompere la catena di sterilità.

I semi con embrione che sino al momento del loro utilizzo sono stati conservati a 4°C, sono ora immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio (1,5%) e tween 80 (1%), per 6-7 minuti per essere sterilizzati e scarificati.

Dopo una serie di lavaggi in acqua sterile ciascuno per un tempo minimo di 30", i semi sono dispersi uniformemente sul terreno di coltura nella capsula Petri. Si elimina l'acqua in eccesso, si sigillano le capsule e si pongono in una camera refrigerata a 25°C al buio per indurre la germinazione dei semi.

Già dopo sei settimane circa si può stimare il tasso di germinazione valutando il numero di protocormi formati rispetto al numero di semi con embrioni messi in coltura.

La crescita procede sottoponendo le capsule a cicli regolari di luce-buio alla temperatura di 23°C e sottoponendo le plantule a trapianti periodici su terreni di coltura freschi.

### *Struttura genetica delle popolazioni mediante microsatelliti*

I microsatelliti sono delle sequenze nucleotidiche di 2-8 bp ripetute più volte in successione formando sequenze di 20-100 bp. La ripetizione (AT)<sub>n</sub> è la più frequente nelle piante, mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione (AC)<sub>n</sub> (Powell *et al.*, 1996). Questi elementi ripetuti, considerati in precedenza come sequenze di DNA superfluo, oggi si ritiene abbiano un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, nel mantenimento dell'integrità strutturale dei cromosomi e nella formazione del centromero, nei processi di ricombinazione e riarrangiamento dell'informazione genetica, nonché negli eventi di evoluzione delle specie.

Diverse sono le caratteristiche che fanno dei microsatelliti degli ottimi marcatori genetici. L'eterozigosità dei microsatelliti produce sistemi multiallelici mostrando un livello estremamente alto di polimorfismo (60-90%), che fornisce una grande quantità di informazione genetica e consente di compiere osservazioni sia sui livelli di inbreeding che sull'entità del flusso genico all'interno e tra le popolazioni vegetali.

Per ciò che concerne lo studio delle orchidee, essi sono stati isolati e caratterizzati in *Ophrys* (Soliva *et al.*, 2000), in *Gymnadenia* (Gustafsson & Thorén, 2001) ed in *Serapias* (Pellegrino *et al.*, 2001). Cinque delle sei coppie di primer note per le specie di questo genere sono state utilizzate per l'amplificazione di altrettanti loci microsatellitari nucleari in 17 popolazioni di *S. vomeracea* ssp. *vomeracea*, ssp. *laxiflora* e ssp. *orientalis*.

Per ogni reazione sono stati necessari 10 ng di DNA stampo a cui è stata aggiunta una miscela costituita da tampone 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTPs 200μM, primer 0,25μM (o il forward o il reverse ha una marcatura fluorescente), *Taq* polimerasi 2.5 U/μl; si procede con un programma di amplificazione avente 25 cicli ognuno dei quali composto dai seguenti step: 94°C per 30 secondi; 55°C per 45 secondi; 72°C per 30 secondi.

Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio 1,5% in tampone TBE 1X e bromuro d'etidio (10mg/ml) unitamente ad

un ladder 100 bp al fine di ottenere una stima informativa della loro lunghezza.

A 10 ng di amplificato, poi, sono stati aggiunti 3  $\mu$ l di formammide e 0,3  $\mu$ l di uno standard interno (GeneScan-500 [ROX]).

I campioni, denaturati ad una temperatura di 92°C per 3 minuti, sono stati caricati in un sequenziatore automatico (373A, Applied Biosystems) su un gel denaturante di poliacrilammide (5,75%).

## Amplified Fragment Length Polymorphisms

La tecnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) descritta per la prima volta da Vos *et al.* (1995) è molto sensibile nel trovare polimorfismi in tutto il genoma e può quindi essere utilizzata per ricercare variabilità inter e intraspecifica o per caratterizzare fenomeni di ibridazione (Hedrèn *et al.*, 2001). È una tecnica che ha il vantaggio di fornire un numero di marcatori potenzialmente molto elevato, di essere applicabile a specie diverse e di avere una buona riproducibilità, anche se presenta difficoltà nell'identificazione e nell'interpretazione dei frammenti di DNA che si ottengono.

La procedura è lunga e complessa ed è caratterizzata da numerose fasi:

1. 300 ng di DNA sono digeriti con due enzimi di restrizione EcoR I & Mse I per 3 ore od over night a 37°C;
2. Al campione digerito si unisce una miscela costituita dagli "adattatori" per EcoR I (15μM) e per Mse I (25μM) già denaturati con un programma a temperatura decrescente (94°C per 3', 70°C per 5'', 60°C per 5'', 50°C per 5'', 40°C per 5'', 25°C per 5'', 14°C per 1'), e dalla ligasi T4 che unisce gli adattatori alle terminazioni dei frammenti di restrizione. Il campione così modificato è incubato a 22°C per un'ora.
3. Si esegue una prima amplificazione (*pre-selettiva*) attraverso primer specifici costruiti sulla sequenza degli adattatori, ma estesi alla terminazione 3' di uno o due nucleotidi arbitrariamente scelti (Tab. 4). Il programma di amplificazione prevede 26 cicli a 94°C per 30'', 60°C per 30'', 72°C per 1'. I prodotti della PCR pre-selettiva sono sottoposti ad una diluizione 1:20 con TE1X (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM);
4. 1μl del campione diluito in precedenza, è il template di una seconda amplificazione (*selettiva*) eseguita con primer la cui sequenza è identica a quella dei primer usati per la pre-selettiva, ma più estesa in 3' di uno o due nucleotidi arbitrariamente scelti (Tab. 5). La PCR, in cui uno dei due primer ha una marcatura fluorescente, è caratterizzata da 10 cicli a 65°C



per 1'30" e 72°C per 1'30" (ad ogni ciclo si riduce la temperatura di annealing di un grado); 25 cicli a 94°C per 30", 56°C per 1'30", 72°C per 1', ed infine ci sono 7' a 72°C;

5. A ciascun campione costituito a questo stadio da una moltitudine di frammenti sono stati aggiunti 25µl di formammide e 0,5µl di standard (GeneScan-500 [ROX]) prima di procedere con la denaturazione a 92°C per 3'. In seguito i campioni sono caricati in un sequenziatore automatico Applied Biosystems (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) e sottoposti a corsa elettroforetica in un capillare contenente gel di poliacrilammide.

La scelta degli enzimi di restrizione e dei due-tre nucleotidi arbitrari in terminazione 3' permette una scelta elevatissima di combinazioni che amplificheranno tratti diversi di DNA. Normalmente con una combinazione enzima-estensione si riescono ad amplificare a 10-20 (talvolta 100) frammenti - potenzialmente loci - diversi.

La tecnica appena descritta, è stata utilizzata per valutare i polimorfismi inter e intraspecifici di *S. vomeracea*, *S. apulica*, *S. cordigera*, *S. lingua*, *S. parviflora* e *S. politisii*. Sono stati esaminati 131 individui in proporzioni diverse per ciascuna specie secondo la qualità del materiale fogliare disponibile. Per ciascuna specie sono stati utilizzati individui provenienti da più popolazioni, italiane e non, in modo da condurre un'analisi rappresentativa del pool genico della specie e non dipendente da una singola popolazione. Unica eccezione è stata fatta per *S. apulica*, specie dalla distribuzione assai limitata di cui erano disponibili solo pochi individui di una popolazione pugliese.

Le indagini molecolari sono state condotte seguendo il protocollo appena descritto, lasciando costanti le condizioni di reazione nelle prime fasi, mentre si è compiuto uno screening con oltre 30 combinazioni di primer differenti nella PCR selettiva.

Tabella 4. Primer usati per le PCR preselettive.

Primer	Sequenza
Eco A	5' GAC TGC GTA CCA ATT C 3'
Mse A	5' GAT GAG TCC TGA GTA AA 3'
Mse C	5' GAT GAG TCC TGA GTA AC 3'

Tabella 5. Alcuni dei primer usati per le PCR selettive.

Primer	Sequenza
E AGT	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG T 3'
E AGA	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG A 3'
E AGC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG C 3'
E ACC	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC C 3'
E ACG	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC G 3'
Mse ATTC	5' GAT GAG TCC TGA GTA AAT TC 3'
Mse ATAG	5' GAT GAG TCC TGA GTA AAT AG 3'
Mse AAG	5' GAT GAG TCC TGA GTA AAA G 3'
Mse AGGC	5' GAT GAG TCC TGA GTA AAG GC 3'
Mse ACAT	5' GAT GAG TCC TGA GTA AAC AT 3'
Mse CGA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACG A 3'
Mse CAA	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA A 3'
Mse CGT	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACG T 3'

## Analisi dei dati

### Analisi filogenetica

Gli elettroferogrammi delle sequenze dei quattro frammenti sono stati controllati ed allineati con l'aiuto di due software BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999) e Sequence Navigator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tenendo conto del criterio di massima parsimonia; ciascuna sequenza è stata confrontata con quelle depositate in Genbank usando il programma BLASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) per confermare che la regione analizzata fosse quella di nostro interesse. In caso di ambiguità nella lettura degli elettroferogrammi sono stati utilizzati i simboli universali proposti dalla nomenclatura IUPAC. Gli indels, invece, sono stati indicati da semplici trattini.

L'analisi filogenetica è stata condotta con PAUP versione 4.0 (Swofford, 2000) usando il metodo di massima parsimonia (MP). I criteri impostati per quest'analisi prevedono che i gap siano considerati come la quinta base (o il 21° aminoacido) e che i bracci dell'unico albero di massima parsimonia ricercato collassino se hanno una lunghezza pari a zero. In aggiunta è stata condotta anche un'analisi bootstrap (Felsenstein, 1985) su mille repliche al fine di stimare l'apporto statistico in ciascun nodo dell'albero.

Per accertare il grado di omoplasia sono stati calcolati i seguenti indici: CI (Consistency index), RI (Retention index), RC (Rescaled consistency index) ed HI (Homoplasy index). CI e RI esprimono la validità dell'albero in termini statistici calcolando, l'uno il rapporto tra il numero minimo dei possibili cambiamenti evolutivi e la reale lunghezza dell'albero, l'altro la relazione tra l'effettivo numero di cambiamenti di un carattere col massimo numero possibile di cambiamenti. RC, invece, è un indice che annulla gli impatti negativi di tutti quei caratteri che non contribuiscono all'assestamento dell'albero (ad esempio le autapomorfie

che hanno  $CI=1$  e  $RI=0$ ) avvalorando la verosimiglianza dell'albero di massima parsimonia. Il valore di  $HI$ , infine, è stato calcolato come  $1-CI$ .

I valori di  $CI$ ,  $RI$  e  $RC$  sono compresi tra zero ed uno e, quanto più si ci avvicina al valore unitario, tanto più aumenta la probabilità che i risultati ottenuti rispondano al vero. Anche il valore di  $HI$  è compreso tra zero ed uno ma, in questo caso, il grado di omoplasia diminuisce approssimandosi allo zero.

La frequenza di ciascun nucleotide, il numero di siti variabili informativi e non, e la percentuale di transizioni/transversioni, sono state calcolate con una parsimony analysis.

L'input file iniziale è stato creato in modo che per ogni specie ci fosse un unico aplotipo, e sono stati impostati come outgroup *Ophrys bertolonii* e *Ophrys incubacea*; *S. politisii*, però, poiché ha mostrato un polimorfismo intraspecifico nelle popolazioni italiane rispetto a quelle greche, è stata considerata come due gruppi distinti.

Le sequenze di ciascun frammento sono state analizzate dapprima individualmente; poi, sono state unite fra loro per un'analisi combinata.

## Processi demografici

### *Biologia della riproduzione*

I dati ottenuti dagli esperimenti sulla biologia della riproduzione sono stati elaborati statisticamente con l'ANOVA avvalendosi di software disponibili in rete (<http://faculty.vassar.edu/lowry//anova1u.html>; <http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>). L'analisi della varianza permette di confrontare due o più gruppi di dati espressi da variabili esplicative di tipo nominale od ordinale, paragonando la variabilità nei gruppi a quella tra essi. Il confronto si basa sull'idea che se la variabilità interna ai gruppi è relativamente elevata rispetto a quella tra essi, allora probabilmente la differenza tra questi è soltanto il risultato della variabilità interna. L'ANOVA è un'analisi statistica più accurata rispetto al t-test perché non considera l'*ipotesi nulla* e vale a dire l'ipotesi che prevede che i dati di tutti i gruppi abbiano la stessa origine, e che le differenze osservate siano dovute solo al caso.

La tabella di output di un ANOVA test è caratterizzata da:

- MS<sub>b</sub>** che esprime la varianza tra i gruppi;
- MS<sub>w</sub>** che esprime la varianza all'interno dei gruppi (errore di varianza);
- F** ovvero il rapporto tra MS<sub>b</sub> e MS<sub>w</sub>, vale a dire la varianza ed il suo errore;
- p** ovvero il grado di significatività di F;
- d.f.** che è il numero dei gradi di libertà per il numeratore e corrisponde al totale dei gruppi esaminati meno uno.

Se il valore di p rilevato è minore del valore soglia pari a 0,05 la diversità tra i gruppi esaminati, è statisticamente significativa.

È importante notare che quando si confrontano soltanto due gruppi, l'analisi della varianza è equivalente al t-test e F è uguale a  $t^2$ .

Il coefficiente di inbreeding depression ( $ID=\delta$ ), che è una misura della diminuzione del successo riproduttivo per individui provenienti da

incroci di self pollination, è stato calcolato solo per gli incroci di *S. vomeracea* e *S. cordigera* secondo la seguente formula:

$(p_{outcross} - p_{self}) / p_{outcross}$ , dove  $p_i$  rappresenta la variabile misurata per ogni tipo di incrocio (Johnston & Schoen, 1994). Secondo quest'equazione, tale coefficiente può variare da -1 a 1 esprimendo per valori negativi, che il successo riproduttivo degli incroci di self pollination è maggiore di quello ottenuto per incroci di allogamia.

### ***Struttura genetica delle popolazioni mediante microsatelliti***

L'analisi dei dati ottenuti è stata condotta con Genescan Analysis e Genotyper software (Perkin-Elmer, Biosystems) per avere informazioni sul genotipo degli individui considerati: lunghezza degli alleli e omozigosità o eterozigosità per ogni locus in esame.

Un'analisi di carattere statistico dei dati ottenuti è stata condotta con il software POPGENE 32 (Yeh *et al.*, 1997), al fine di valutare la variabilità molecolare all'interno e tra le popolazioni studiate, la frequenza allelica per ciascun locus, la percentuale di loci polimorfici, il numero medio di alleli per locus ( $A_o$ ), l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) ad ogni locus e quella attesa ( $H_e$ ).

La possibile divergenza delle distribuzioni genotipiche osservate dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è stata valutata con il programma GENEPOP v. 3.1 usando il test di probabilità (Raymond & Rousset, 1995), mentre gli indici F-statistics sono stati calcolati con Fstat 2.9.1 in accordo con quanto indicato da Weir & Cockerham (1984). In particolare, è stato valutato l'indice di fissazione o  $F_{IS}$ , che dà una stima del coefficiente di inbreeding essendo una misura di deficienza o eccesso di eterozigoti all'interno di una popolazione (per valori, rispettivamente, positivi e negativi di  $F_{IS}$ ); l' $F_{IT}$  che misura la riduzione di eterozigosità di un individuo in relazione alla popolazione totale; l' $F_{ST}$  che rappresenta la riduzione di eterozigosità di una sottopopolazione a causa della deriva genetica casuale e permette l'analisi gerarchica della struttura genetica

delle popolazioni (Hartl & Clark, 1989). Se il suo valore è pari a zero, allora tutta la variabilità è all'interno delle popolazioni, se è pari ad uno, tutta la variabilità è fra le popolazioni. Il calcolo dell' $F_{ST}$  a coppie permette di eseguire un'analisi "ponderata" della varianza molecolare fra due popolazioni, tra le quali si esamina il livello di differenziazione.

I dati microsatellitari sono stati usati, ancora, per indagini su fenomeni di bottleneck a cui le popolazioni potrebbero essere soggette (Bottleneck 1.2.02 - Cornuet & Luikart, 1996), e per stimare eventuali correlazioni tra la distanza geografica e i livelli di diversità genetica esistenti tra le popolazioni di ciascun taxon (Mantel test, GENEPOP v. 3.1).

E' stato, infine, calcolato  $\theta$ , ( $4N_e\mu$  con  $N_e$ =dimensione effettiva della popolazione e  $\mu$ =tasso di mutazione per locus) per ciascuna popolazione usando Migrate 0.9 (Beerly & Felsenstein, 1999). Il valore di theta misura gli effetti genetici sulla dimensione della popolazione assumendo un tasso di mutazione costante per tutti i loci considerati.

## Amplified Fragment Length Polymorphisms

La visualizzazione e l'analisi dei frammenti AFLP sono state effettuate con il software GeneMapper® v4.0, (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per ogni campione è stata stimata la lunghezza di ciascun frammento al fine di creare una matrice binaria in cui ogni banda fosse identificata in ogni individuo come presente o assente (1-0).

Questi dati sono serviti per la creazione di un data set in cui a ciascuna specie corrisponde un numero variabile di individui ed ognuno di essi ha uno specifico genotipo. L'analisi di questi dati è stata condotta con GenAlex v.6 (Peakall & Smouse, 2006) e con PAUPv4.0 (Swofford, 2000). GenAlex ha permesso di effettuare l'analisi delle componenti principali (PCA) al fine di esprimere graficamente l'informazione contenuta nel data set, sintetizzandola secondo poche combinazioni lineari delle variabili in esame. Dal punto di vista geometrico, la PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali, in modo tale che il primo asse (che costituirà la prima componente principale) sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati, il secondo sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza, e così di seguito per tutti i nuovi assi il cui numero sarà quindi pari al numero di variabili originali. In genere, la prima e la seconda componente spiegano la maggiore percentuale della variabilità totale.

Mediante l'utilizzo di GenAlex è stata poi effettuata l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) a livello inter e intraspecifico, è stata calcolata la percentuale di loci polimorfici, l'identità genetica di Nei (1972) che valuta la proporzione di geni che sono identici tra due popolazioni e la distanza genetica di Nei (1972) che stima, invece, la proporzione di cambi genici che avvengono nell'evoluzione separata di due popolazioni.

PAUP è stato utilizzato, invece, per la costruzione di un albero con il metodo Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), il cui algoritmo permette



la ricostruzione filogenetica di una serie di individui a partire dalla matrice delle distanze genetiche.

## Risultati

### Filogenesi

Le quattro regioni del DNA plastidiale amplificate hanno una lunghezza che varia dalle 229 bp (introne dell'*AtpF*) alle 819 bp (introne dell'*rps16*). Le 14 specie esaminate differiscono fra loro per la presenza di 9 indels che oscillano da 1 a 6 bp - 3 indels di 1bp, 3 indels di 2bp, 1 indel di 3 bp, 2 indels di 6 bp - e per un numero esiguo di transizioni e trasversioni. Oltre il 95% dei caratteri propri di ciascuna sequenza sono costanti, mentre quelli variabili, non sempre sono informativi.

Il frammento che mostra il maggior numero di polimorfismi è lo spaziatore interposto tra il gene del tRNA per la Serina e quello per la Glicina - *trnS-trnG* - con 13 caratteri variabili e informativi su un totale di 625 bp. Le caratteristiche delle sequenze proprie di ciascuna regione sono schematizzate nella tabella 6.

L'analisi filogenetica è stata condotta inizialmente analizzando singolarmente ciascuna regione del cpDNA, ma gli alberi di massima parsimonia ottenuti hanno mostrato un elevato grado di politomia. In seguito, le sequenze dei quattro frammenti sono state unite e le analisi sono state condotte su 2152 caratteri, 1739 dei quali costanti, 14, seppur variabili, non informativi e 399 informativi.

L'albero di massima parsimonia, lungo 427 step, ripartisce le specie in due gruppi (A e B) e due sottogruppi (A1 - A2; B1 - B2) ben distinti tra loro e ben supportati da alti valori di bootstrap (Fig. 8). Le popolazioni Italiane di *S. politisii* sono inserite in un gruppo diverso da quello delle popolazioni Greche. Il valore degli indici che misurano il grado di omoplasia dell'albero sono: CI=0,986 (il valore non cambia se si escludono dall'analisi i caratteri non informativi), RI=0,988, RC=0,974 e HI=0,014.

Tabella 6. Caratteristiche delle sequenze delle quattro regioni plastidiali.

<i>Serapias</i>	<i>Introni</i>		<i>spaziatori</i>	
	<i>atpF</i>	<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>	<i>trnS-G</i>
Range di lunghezza	229 - 230	819 - 820	335 - 341	630 - 635
% GC	24,3	29,5	33,9	29
n° di indels	1	1	4	3
Caratteri costanti	221	810	335	625
Caratteri variabili	6	7	6	13
Caratteri variabili informativi	3	5	6	13

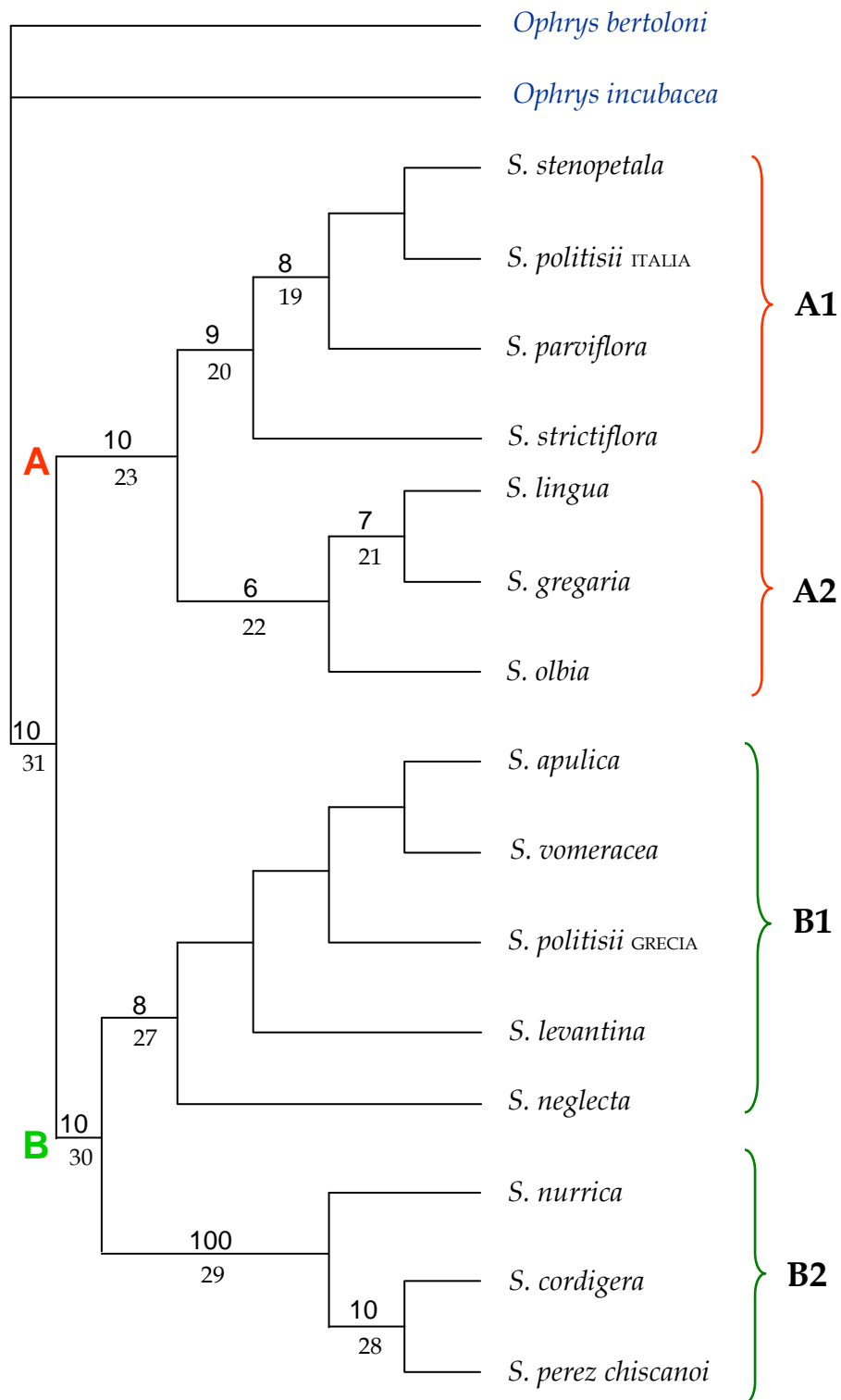


Figura 8. Albero di massima parsimonia ottenuto dall'analisi dei dati delle sequenze plastidiali in cui si possono distinguere due gruppi principali (A e B). I numeri sotto i bracci indicano il numero di step, mentre quelli scritti sopra sono i valori di bootstrap espressi in percentuale (non sono indicati i valori minori del 50%).

## Processi demografici

### *Biologia della riproduzione.*

Delle sei specie testate, la sola *S. parviflora* ha dimostrato di essere in grado di effettuare autogamia spontanea, producendo capsule nel 48% dei fiori esaminati. La conferma che il fenomeno avviene in questa specie senza l'intervento di un insetto impollinatore, è stata ottenuta osservando allo stereomicroscopio la presenza di masse polliniche sullo stigma di fiori in preantesi (Figg. 9-10). Osservazioni al microscopio ottico hanno evidenziato che il 90% dei semi prodotti in *S. parviflora* per autogamia spontanea contiene un embrione e che il 98% di tali semi germina, formando il protocormo in circa 30 giorni.

Gli incroci manuali di autogamia e geitonogamia condotti su *S. vomeracea* hanno prodotto il 57,14% e il 42,85% di capsule contro l'85,7% degli incroci di allogamia intraspecifica. In *S. cordigera* le capsule prodotte sono state del 71,43% negli incroci di autogamia, del 42,85% in quelli di geitonogamia e dell'85,7% in quelli di allogamia intraspecifica (Tab. 7).

Nel complesso, la percentuale di semi con embrione degli incroci di self pollination, cioè la media dell'autogamia e della geitonogamia, è più bassa di quella degli incroci allogami. L'ANOVA (Tab. 8) ha evidenziato che le differenze tra queste due percentuali sono significative.

Inoltre, in entrambe le specie in esame, la capacità di germinazione dei semi è stata estremamente bassa, con non più del 5% in quelli derivanti da auto impollinazione, e significativamente differente (Tab. 8), rispetto a quella dei semi da impollinazione incrociata (max 70%).

Da notare che i valori di capsule prodotte (50-57%), di semi con embrione (2,5-25,25) e di semi germinati (5%) ottenuti dagli esperimenti di self pollination mostrano, in entrambe le specie, un forte e progressivo decremento, che non si osserva per gli esperimenti di alloincrocio. (Fig. 11).



Figura 9. Fotografie realizzate allo stereomicroscopio in cui è evidente lo sfaldamento delle antere, in fiori in preantesi di *S. parviflora*.



Figura 10. Fotografie realizzate allo stereomicroscopio che mostrano la presenza di masse polliniche sullo stigma di fiori in preantesi di *S. parviflora*.

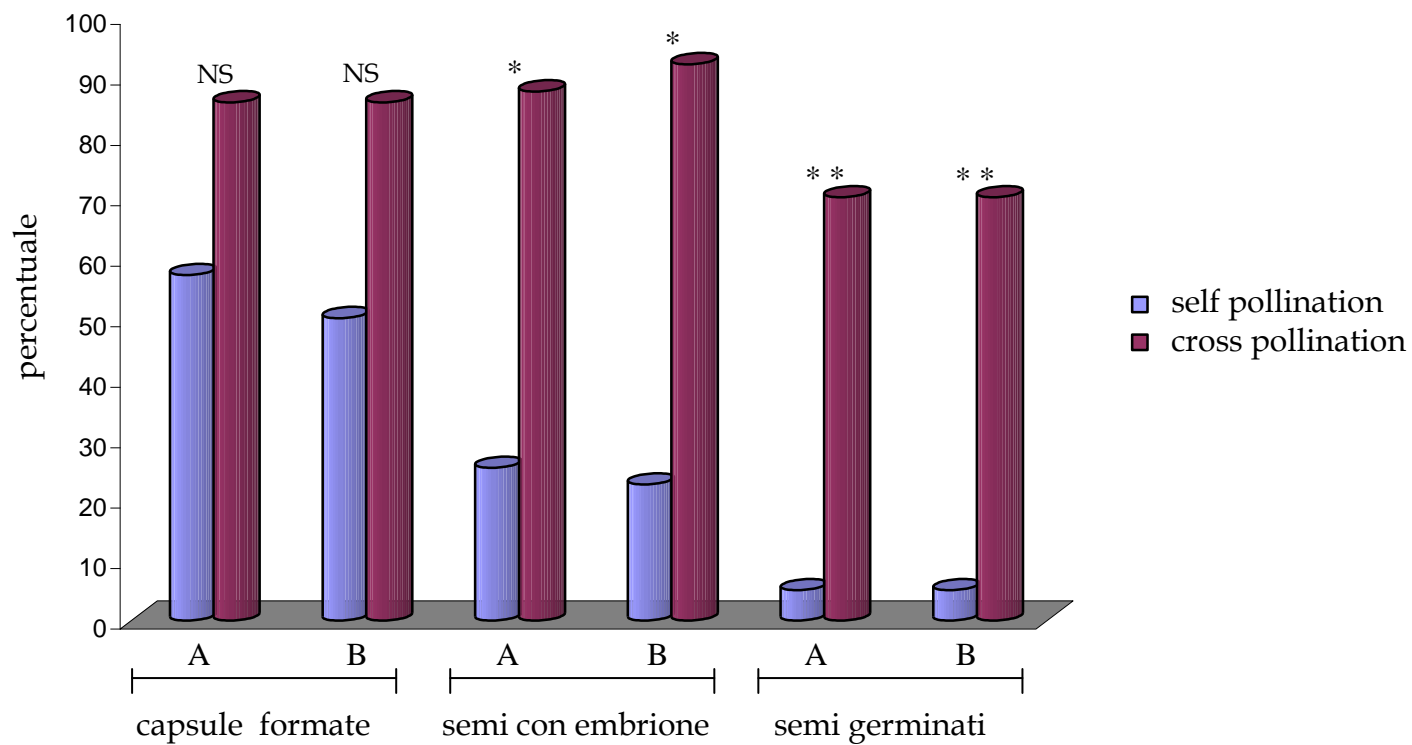


Figura 11. Confronto della percentuale di capsule prodotte, di semi con embrioni e di semi germinati negli incroci di self pollination (autogamia e geitonogamia) e cross pollination (allogamia) a livello intraspecifico - *S. cordigera* (A), *S. vomeracea* (B) -.

NS = differenza non significativa    \* differenza poco significativa    \*\* differenza mediamente significativa

Per quanto riguarda i 14 incroci interspecifici, la percentuale di capsule prodotte varia significativamente (Tab. 8) dal 50%, ottenuto per *S. vomeracea* x *S. parviflora*, al 100%, registrato in 7 incroci (Tab. 9). Tuttavia, bisogna precisare, che il successo riproduttivo degli incroci di *S. parviflora*, potrebbe essere alterato dall'ipotetico contatto tra le massule polliniche e lo stigma di tali fiori nella fase della rimozione dei pollinodi o in precedenza. Negli stessi incroci, la percentuale di semi con embrione oscilla dal 36% per gli incroci di *S. vomeracea* x *S. lingua*, giustificato, probabilmente, dal fatto che *S. lingua* possiede un corredo tetraploide, all'89% per gli incroci di *S. parviflora* x *S. cordigera* (Tab. 10).

Il tasso di germinabilità è stato valutato per i semi con embrione derivanti dall'autogamia spontanea di *S. parviflora* e per gli incroci tra *S. vomeracea* e *S. cordigera* (Tab. 11). In quest'ultimo caso la percentuale riscontrata negli incroci interspecifici (96-98%), è stata significativamente più alta di quella degli incroci intraspecifici (Fig. 12).

Il coefficiente di inbreeding depression ( $ID=\delta$ ) calcolato per *S. vomeracea* e *S. cordigera* è sempre positivo (Fig. 13) ed aumenta progressivamente al succedersi delle tappe della riproduzione considerate, vale a dire produzione di frutti, presenza di semi embrionati, germinazione.



Tabella 8. Analisi ANOVA per gli incroci intra ed interspecifici: **MS** (MSb +MSw)= varianza; **F**= rapporto tra Msb e Msw; **d.f.**= numero dei gradi di libertà; **p**= grado di significatività di F.

La significatività di **p** aumenta al diminuire del suo valore (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns= non significativo).

		<b>MS</b>	<b>d.f.</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	
<b>incroci interspecifici</b>		frutti	0,233	13	1,991	0,028*
		embrioni	0.1541	13	649.7	< 0,0001***
		germinabilità	0,0004	1	6	0,231 ns
<b>incroci intraspecifici</b>	Self vs cross <i>S. cordigera</i>	frutti	0,381	1	1,688	0,21 ns
		embrioni	3875,06	1	23,80	0,0395*
		germinabilità	4556,25	1	145,8	0,0068**
	Self vs cross <i>S. vomeracea</i>	frutti	0,5953	1	2,5962	0,12 ns
		embrioni	4830,25	1	30,142	0,0316*
		germinabilità	4556,25	1	145,8	0,0068**
	Self <i>S. cordigera</i> vs self <i>S. vomeracea</i>	frutti	0,25	1	0,2	0,698 ns
		embrioni	7,5625	1	0,0237	0,892 ns
		germinabilità	0,0001	1	0,0909	0,773 ns
	Cross <i>S.</i> <i>cordigera</i> vs cross <i>S.</i> <i>vomeracea</i>	frutti	0	1	0	1 ns
		embrioni	0,042	1	21	0,015**
		germinabilità	0,0525	1	0,71	0,43 ns
Cross <i>S. cordigera</i> interspecifico vs cross <i>S. cordigera</i> intraspecifico	frutti	0	1	0	1 ns	
	embrioni	0.082	1	820	< 0.0001***	
	germinabilità	0.1568	1	784	< 0.0001***	
Cross <i>S. vomeracea</i> interspecifico vs cross <i>S. vomeracea</i> intraspecifico	frutti	0.0001	1	0	1 ns	
	embrioni	0.188	1	1872	<0.0001***	
	germinabilità	0.101	1	1014	< 0.0001***	

Tabella 9. Percentuale di capsule prodotte per ogni incrocio inter specifico e, per autogamia spontanea, in *S. parviflora* \*.

♂	♀	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>
<i>S. vomeracea</i>			90	50	100
<i>S. cordigera</i>		71,5		100	66,6
<i>S. parviflora</i>		100	100	48 *	100
<i>S. politisii</i>		91,6		77,7	
<i>S. lingua</i>		57	100	100	

Tabella 10. Percentuale di semi con embrione riscontrate negli incroci inter specifici e nelle capsule autogame di *S. parviflora* (\*).

♂	♀	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>
<i>S. vomeracea</i>			79	41	36
<i>S. cordigera</i>		59		75,6	38
<i>S. parviflora</i>		43	89	90*	78,4
<i>S. politisii</i>		73,8		56	
<i>S. lingua</i>		65,2	65,6	43,6	

Tabella 11. Percentuale di semi con embrione germinati negli incroci di *S. vomeracea* e *S. cordigera* ed in *S. parviflora*.

		<i>S. parviflora</i>	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>
	autogamia spontanea	98		
Self pollination	autogamia indotta		0	0
	geitonogamia		5	5
Cross pollination	allogamia intraspecifica		70	70
	allogamia interspecifica		x <i>S. cordigera</i> 96	x <i>S. vomeracea</i> 98

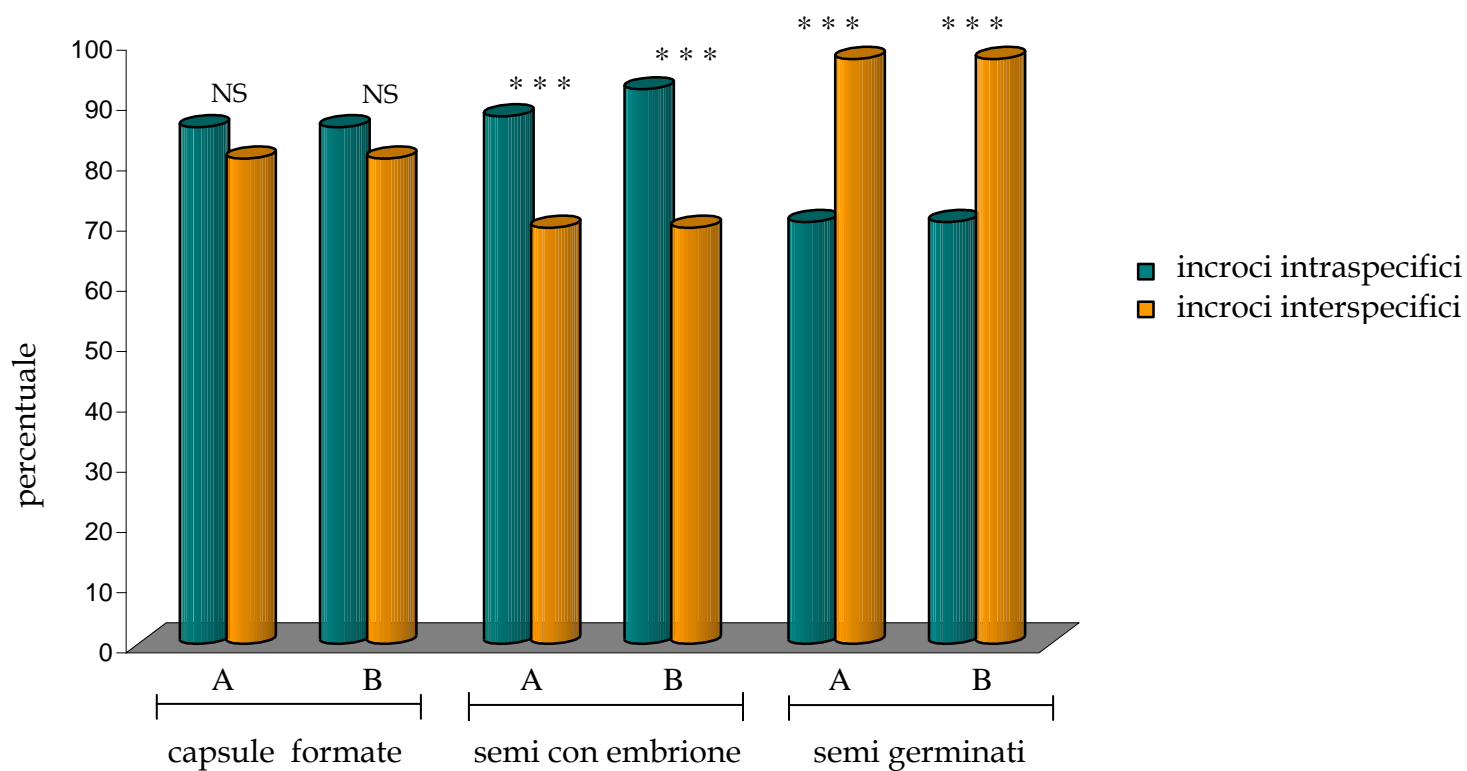


Figura 12. Confronto della percentuale di capsule prodotte, di semi con embrioni e di semi germinati negli incroci inter e intra specifici di *S. cordigera* (A) e *S. vomeracea* (B). NS = differenza non significativa \*\*\*differenza altamente significativa

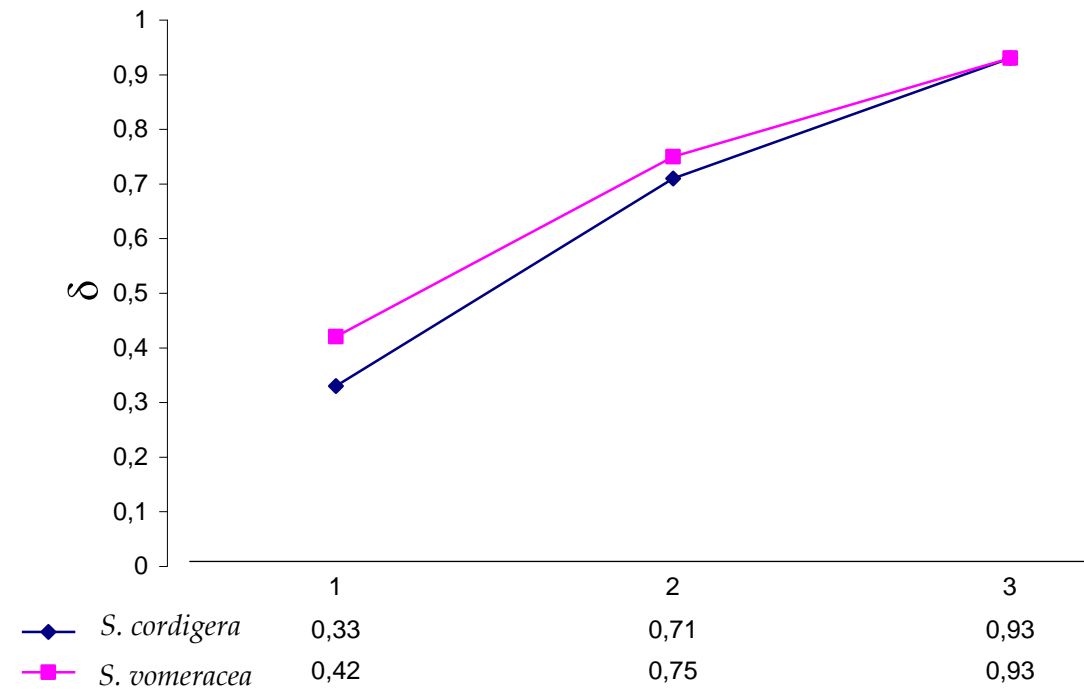


Figura 13. Coefficiente di inbreeding depression ( $\delta$ ) relativo alla formazione di capsule (1), alla presenza di semi con embrione (2), e alla percentuale di semi germinati (3) in *S. cordigera* e *S. vomeracea*.

### *Struttura genetica delle popolazioni mediante microsatelliti*

I loci microsatelliti sono polimorfici in tutte le 20 popolazioni esaminate, escluso il locus Sv01 che è fissato in due popolazioni di ssp. *laxiflora*. Il numero totale di alleli per locus è compreso tra 4 (Sv01) e 10 (Sv02), mentre il numero medio di alleli varia da 2,4 a 4,4 (Tab. 12). Sono stati trovati due alleli esclusivi in *S. vomeracea* ssp. *vomeracea* al locus Sv02 e quattro in ssp. *orientalis*, uno per locus tranne per Sv05.

L'eterozigosità osservata varia da 0,39 e 0,71 ed è maggiore o uguale di quella attesa nella maggior parte delle popolazioni esaminate. Nove delle tredici popolazioni di ssp. *vomeracea* non si trovano in equilibrio di Hardy-Weinberg come dimostrato dai valori di  $F_{IS}$  che sono compresi tra -0,02 e -0,25 mostrando, così, un eccesso di eterozigosità. L'unica eccezione è la popolazione SvVsic che mostra, invece, un eccesso di omozigosità con  $F_{IS} = 0,12$ . Due popolazioni di ssp. *laxiflora* e tutte quelle di ssp. *orientalis*, mostrano un eccesso di omozigosità come evidenziato nella tabella 12.

I valori di  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$  tra le sottospecie esaminate sono compresi in un intervallo molto variabile (Tab. 13). In particolare l' $F_{IT}$  (l'inbreeding totale) ha un valore basso in ssp. *vomeracea* e molto più alto in ssp. *laxiflora* e ssp. *orientalis*, mentre l' $F_{ST}$  mostra il valore più basso (0,039) in ssp. *orientalis*. La misura di  $F_{ST}$  a coppie (Tab. 14) varia tra -0,017 (SvoPug1-SvoPug2) 0,342 (SvvNor1-SvlCal2), ma quest'ampia variazione che indica sia forte affinità che forte isolamento, è osservabile anche tra popolazioni dello stesso taxon. Tali valori non sono in relazione né alla distribuzione geografica né all'attribuzione tassonomica. Infatti, i valori attribuiti alle sei popolazioni calabresi variano da 0,037 (SvvCal2-SvvCal6) a 0,262 (SvvCal4-SvvCal5), e sono simili a quelli ottenuti tra le popolazioni calabresi e le rimanenti popolazioni di ssp. *vomeracea* che variano da 0,015 a 0,239.

Tabella 12. Numero medio di alleli per locus (Ao), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He), coefficiente di inbreeding ( $F_{IS}$ ) espressi per ciascuna popolazione (italiana ●, greca ●) delle tre sottospecie del gruppo di *S. vomeracea*.

\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns= non significativo.

	Sottospecie	Luogo di provenienza	Dimensioni della popolazione (<)	Ao $\pm$ s.d.	Ho $\pm$ s.d.	He $\pm$ s.d.	$F_{IS}$ all loci
1	<i>vomeracea</i>	● SvCal1	100	2.6 $\pm$ 0.8	0.56 $\pm$ 0.27	0.46 $\pm$ 0.12	-0.18***
2		● SvCal2	100	3.8 $\pm$ 2.0	0.67 $\pm$ 0.15	0.56 $\pm$ 0.17	-0.19**
3		● SvCal3	100	3.0 $\pm$ 1.0	0.67 $\pm$ 0.15	0.63 $\pm$ 0.11	-0.06*
4		● SvCal4	200	3.2 $\pm$ 1.7	0.56 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.11	-0.12*
5		● SvCal5	100	2.4 $\pm$ 0.5	0.50 $\pm$ 0.11	0.50 $\pm$ 0.11	-0.02**
6		● SvCal6	200	3.0 $\pm$ 1.2	0.60 $\pm$ 0.21	0.58 $\pm$ 0.08	-0.05**
7		● SvNor1	100	3.2 $\pm$ 0.4	0.57 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.06	-0.04ns
8		● SvNor2	100	3.0 $\pm$ 1.2	0.66 $\pm$ 0.21	0.53 $\pm$ 0.15	-0.25*
9		● SvSic	200	3.0 $\pm$ 1.2	0.52 $\pm$ 0.21	0.61 $\pm$ 0.09	0.12**
10		● SvPug	100	3.0 $\pm$ 1.0	0.62 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.11	-0.01ns
11		● SvMol	200	2.8 $\pm$ 0.8	0.71 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.11	-0.13ns
12		● SvTus	100	2.8 $\pm$ 1.3	0.71 $\pm$ 0.09	0.59 $\pm$ 0.11	-0.22ns
13		● SvKer	200	3.0 $\pm$ 1.2	0.70 $\pm$ 0.18	0.63 $\pm$ 0.11	-0.12*
14	<i>laxiflora</i>	● SvCal1	200	3.2 $\pm$ 0.8	0.41 $\pm$ 0.25	0.57 $\pm$ 0.11	0.31***
15		● SvCal2	100	3.0 $\pm$ 1.4	0.54 $\pm$ 0.26	0.45 $\pm$ 0.25	-0.18**
16		● SvSic	100	3.2 $\pm$ 0.8	0.39 $\pm$ 0.22	0.61 $\pm$ 0.10	0.39***
17		● SvKer	50	3.0 $\pm$ 1.4	0.59 $\pm$ 0.25	0.53 $\pm$ 0.25	-0.11ns
18	<i>orientalis</i>	● SvSic	100	4.0 $\pm$ 1.7	0.55 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.04	0.21*
19		● SvPug1	200	4.2 $\pm$ 0.8	0.60 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.06	0.18***
20		● SvPug2	100	4.4 $\pm$ 0.8	0.61 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.04	0.18***

Tabella 13. Valori di  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  per ciascuna sottospecie del gruppo di *S. vomeracea*.

Locus	<i>ssp. vomeracea</i>			<i>ssp. laxiflora</i>			<i>ssp. orientalis</i>					
	n	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	n	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	n	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
Sv01	446	-0.021	0.077	0.096	136	1.000	1.000	0.450	94	0.280	0.327	0.065
Sv02	446	0.005	0.110	0.105	136	-0.005	0.029	0.034	94	0.178	0.236	0.070
Sv03	446	0.043	0.175	0.137	136	0.236	0.323	0.114	94	0.130	0.133	0.003
Sv05	446	-0.266	-0.127	0.110	136	-0.173	-0.081	0.078	94	0.176	0.198	0.027
Sv06	446	-0.357	-0.216	0.104	136	-0.140	-0.064	0.067	94	0.037	0.062	0.025
mean	446	-0.120	0.005	0.111	136	0.080	0.198	0.128	94	0.160	0.193	0.039



Tabella 14.  $F_{ST}$  a coppie stimato per tutti i loci delle popolazioni del gruppo di *S. vomeracea*.

	SvvCal1	SvvCal2	SvvCal3	SvvCal4	SvvCal5	SvvCal6	SvvNor1	SvvNor2	SvvSic	SvvPug	SvvMol	SvvTus	SvvKer	SvlCal1	SvlCal2	SvlSic	SvlKer	SvoSic	SvoPug1	
SvvCal2	0.064+++																			
SvvCal3	0.150+++	0.108+++																		
SvvCal4	0.256+++	0.226+++	0.134+++																	
SvvCal5	0.116+++	0.158+++	0.079+++	0.262+++																
SvvCal6	0.089+++	0.037+++	0.048+++	0.142+++	0.110+++															
SvvNor1	0.098+++	0.046+++	0.109+++	0.195+++	0.175+++	0.037+++														
SvvNor2	0.101+++	0.040+++	0.142+++	0.239+++	0.169+++	0.058+++	0.083+++													
SvvSic	0.109+++	0.071+++	0.045+++	0.164+++	0.114+++	-0.002ns	0.098+++	0.101+++												
SvvPug	0.150+++	0.091+++	0.004ns	0.121+++	0.124+++	0.050+++	0.090+++	0.102+++	0.061+++											
SvvMol	0.158+++	0.097+++	-0.003ns	0.151+++	0.112+++	0.042+++	0.115+++	0.108+++	0.031+++	-0.015ns										
SvvTus	0.122+++	0.063+++	0.069+++	0.153+++	0.145+++	-0.008ns	0.082+++	0.091+++	-0.007ns	0.075+++	0.060+++									
SvvKer	0.093+++	0.062+++	0.026+++	0.135+++	0.087+++	0.015+++	0.076+++	0.094+++	0.013+++	0.027+++	0.026+++	0.001++								
SvlCal1	0.118+++	0.130+++	0.088+++	0.232+++	0.094+++	0.073+++	0.120+++	0.196+++	0.040+++	0.136+++	0.117+++	0.089+++	0.080+++							
SvlCal2	0.356+++	0.335+++	0.187+++	0.300+++	0.238+++	0.229+++	0.343+++	0.313+++	0.157+++	0.202+++	0.164+++	0.225+++	0.202+++	0.185+++						
SvlSic	0.144+++	0.132+++	0.052+++	0.163+++	0.110+++	0.060+++	0.136+++	0.196+++	0.015+++	0.107+++	0.083+++	0.067+++	0.068+++	-0.006ns	0.174+++					
SvlKer	0.320+++	0.263+++	0.166+++	0.199+++	0.246+++	0.179+++	0.289+++	0.249+++	0.127+++	0.145+++	0.123+++	0.170+++	0.154+++	0.201+++	0.051ns	0.170+++				
SvoSic	0.187+++	0.139+++	0.146+++	0.210+++	0.212+++	0.120+++	0.159+++	0.173+++	0.106+++	0.154+++	0.151+++	0.085+++	0.089+++	0.160+++	0.295+++	0.142+++	0.240+++			
SvoPug1	0.182+++	0.115+++	0.135+++	0.200+++	0.199+++	0.113+++	0.114+++	0.160+++	0.110+++	0.154+++	0.154+++	0.105+++	0.106+++	0.141+++	0.320+++	0.107+++	0.259+++	0.047+++		
SvoPug2	0.180+++	0.111+++	0.105+++	0.161+++	0.178+++	0.068+++	0.093+++	0.134+++	0.067+++	0.117+++	0.113+++	0.057+++	0.071+++	0.114+++	0.252+++	0.084+++	0.194+++	0.032+++	-0.017ns	

Allo stesso tempo, le popolazioni di *ssp. orientalis* mostrano bassi livelli di differenziazione sia tra loro, che con le popolazioni delle altre sottospecie. Questo dato è corroborato dal risultato del Mantel test che indica che le popolazioni spazialmente più vicine non sono necessariamente quelle più geneticamente affini.

L'analisi per l'individuazione di fenomeni di bottleneck ha mostrato un eccesso di eterozigotità secondo il criterio IAM (infinite alleles model) e TPM (two phase model) rispettivamente in 20 e 18 delle popolazioni esaminate (Tab. 15), evidenziando che la maggior parte di esse potrebbe aver subito una riduzione del numero degli individui che le compongono.

Ad ogni modo, Cornuet e Luikart (1996) hanno precisato che le popolazioni e i loci che non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg potrebbero influenzare i risultati del test.

Assumendo che il tasso di mutazione dei microsatelli è di  $10^{-3}$ , è stato calcolato che  $N_e$  varia da 46 (SvvCal1) a 105 (SvlCal2) (Tab. 15). Le stime del numero effettivo dei migranti sono state basse, raggiungendo, raramente, valori maggiori di 1.

Tabella 15. Stima eccesso di eterozigosità secondo il criterio IAM (infinite alleles model) e TPM (two phase model).

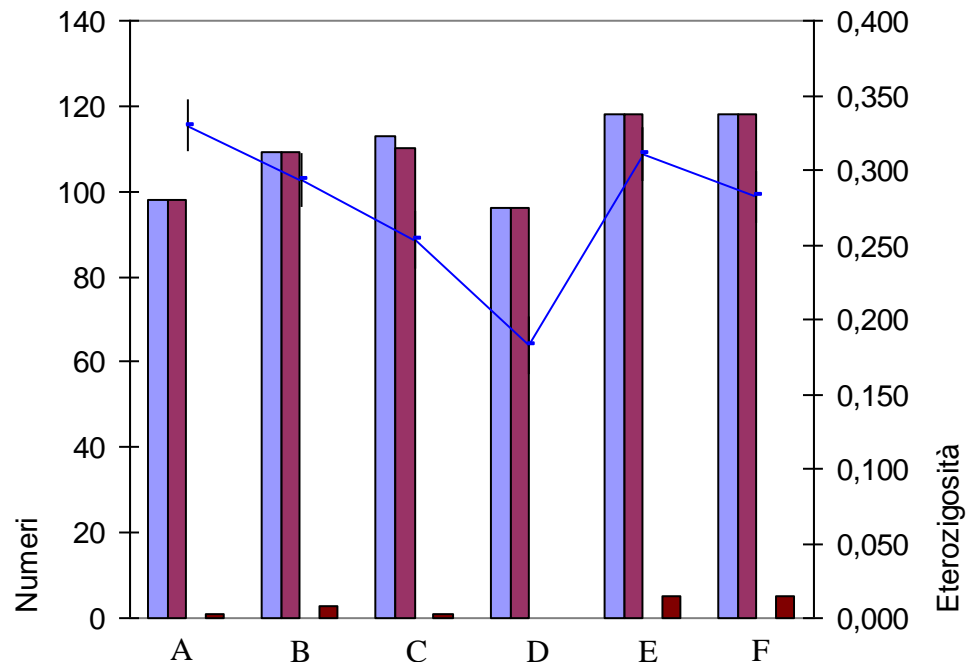
of whether a population exhibits a significant number of loci with gene diversity in excess respect to mutation-drift equilibrium at IAM and TPM. Stima delle dimensioni effettive delle popolazioni ( $N_e$ ) assumendo per i microsatelliti un tasso di mutazione di  $10^{-3}$ .

<b>popolazione</b>	IAM	TPM	$N_e$
<i>SvvCal1</i>	0.046	0.046	46
<i>SvvCal2</i>	0.015	0.015	70
<i>SvvCal3</i>	0.015	0.015	55
<i>SvvCal4</i>	0.046	0.312	75
<i>SvvCal5</i>	0.015	0.015	53
<i>SvvCal6</i>	0.015	0.015	73
<i>SvvNor1</i>	0.015	0.015	70
<i>SvvNor2</i>	0.015	0.015	62
<i>SvvSic</i>	0.015	0.015	58
<i>SvvPug</i>	0.015	0.015	69
<i>SvvMol</i>	0.015	0.015	51
<i>SvvTus</i>	0.015	0.015	64
<i>SvvKer</i>	0.015	0.015	72
<i>SvlCal1</i>	0.031	0.046	93
<i>SvlCal2</i>	0.062	0.156	105
<i>SvlSic</i>	0.015	0.031	76
<i>SvlKer</i>	0.031	0.031	59
<i>SvoSic</i>	0.031	0.031	79
<i>SvoPug1</i>	0.015	0.015	71
<i>SvoPug2</i>	0.015	0.015	67

## Amplified Fragment Length Polymorphisms

Delle trenta combinazioni di primer testate nelle PCR selettive, ne sono state scelte solo quattro (ACG-CAA, AGT-CGT, ACC-AGGC, AGC-AAG) poiché queste hanno amplificato un discreto numero di frammenti (~ 30). Nei 131 individui considerati in 6 specie diverse, 118 sono i frammenti analizzati (loci), con un polimorfismo che varia dal 44,9 % al 77,9%. Non ci sono bande esclusive per nessuna specie, ma la maggior parte delle bande sono comuni a tutte le specie con una percentuale superiore al 50%. I livelli di eterozigotità variano da un minimo di 0,183 in *S. apulica* ad un massimo di 0,330 in *S. parviflora* (Fig. 14).

La PCA risolve nello spazio la separazione delle specie del 17,85% per il primo asse, dell'8,20% per il secondo asse e del 6,18% per il terzo asse (Fig. 15). L'identità e la distanza genetica di Nei indicate nella tabella 16 mostrano che *S. parviflora* e *S. lingua* sono le specie geneticamente più affini, mentre l'AMOVA evidenzia che la variabilità tra le specie (32%) è minore di quella riscontrata all'interno di esse (68%) (Fig. 16). L'albero ottenuto con il metodo del Neighbor-joining (Fig. 17), lungo 1680 step, separa adeguatamente le specie esaminate fatta eccezione per *S. lingua/S. parviflora*, i cui individui si mescolano in un distinto clado. Gli indici che descrivono quest'albero sono CI (Consistency index)= 0,0690, e HI (Homoplasy index)= 0,9310.



Specie	A	B	C	D	E	F
N. Bande	98	109	113	96	118	118
N. Bande Freq. >= 5%	98	109	110	96	118	118
N. Bande Private	0	0	0	0	0	0
N. Bande Comuni <=50%	1	3	1	0	5	5
Eterozigosità media	0,330	0,293	0,254	0,183	0,311	0,282

Figura 14. Istogramma in cui sono evidenziati i valori di eterozigosità e le percentuali di bande comuni e non dell'analisi degli AFLP in sei specie del genere *Serapias*:

- A. *S. parviflora*
- B. *S. lingua*
- C. *S. politisii*
- D. *S. apulica*
- E. *S. vomeracea*
- F. *S. cordigera*

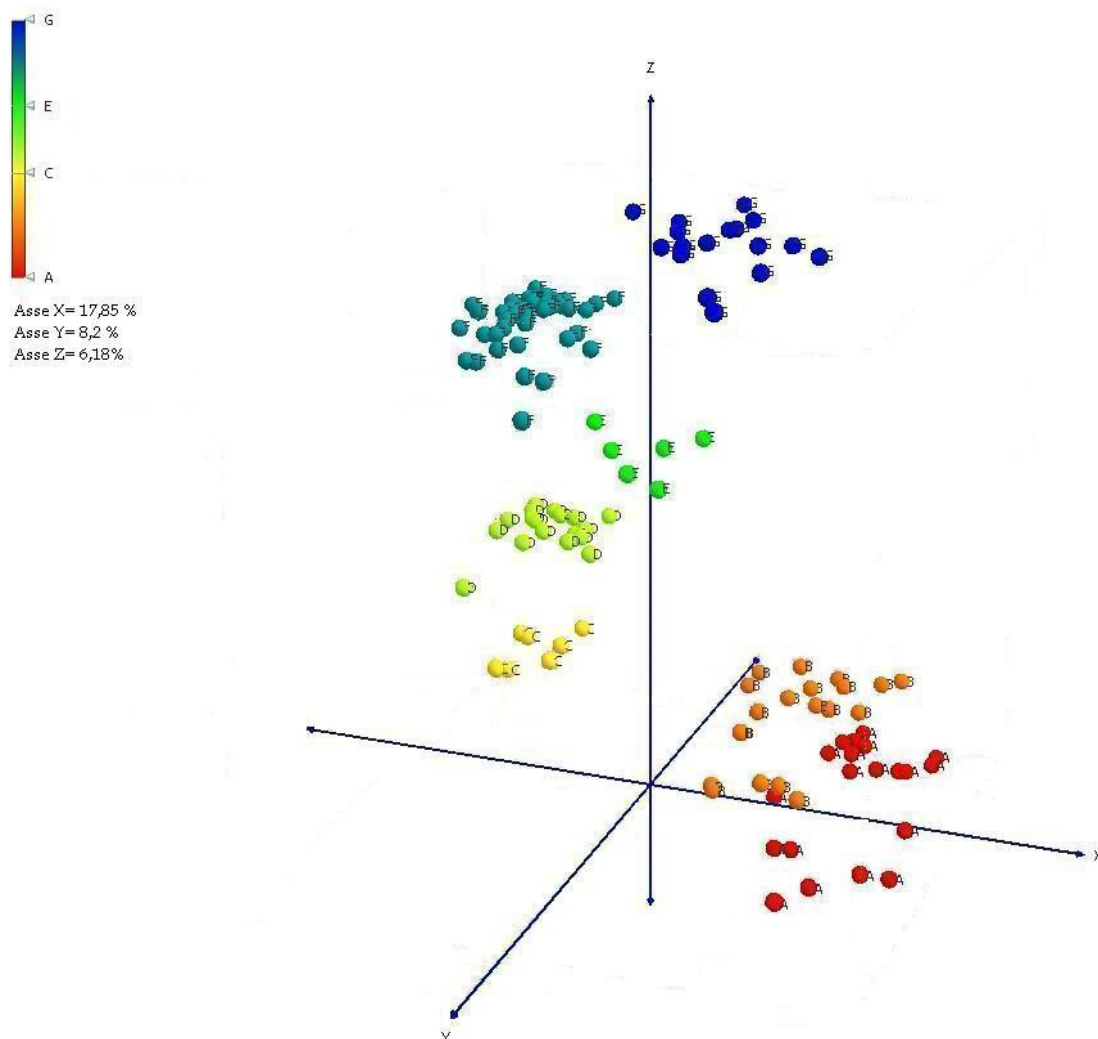


Figura 15. Analisi delle componenti principali ottenuta per sei specie del genere *Serapias*:

- |      |   |
|------|---|
| A.   | <i>S. parviflora</i>                                |
| B.   | <i>S. lingua</i>                                    |
| C.D. | <i>S. politisii</i> (popolazioni Italiane e Greche) |
| E.   | <i>S. apulica</i>                                   |
| F.   | <i>S. vomeracea</i>                                 |
| G.   | <i>S. cordigera</i>                                 |

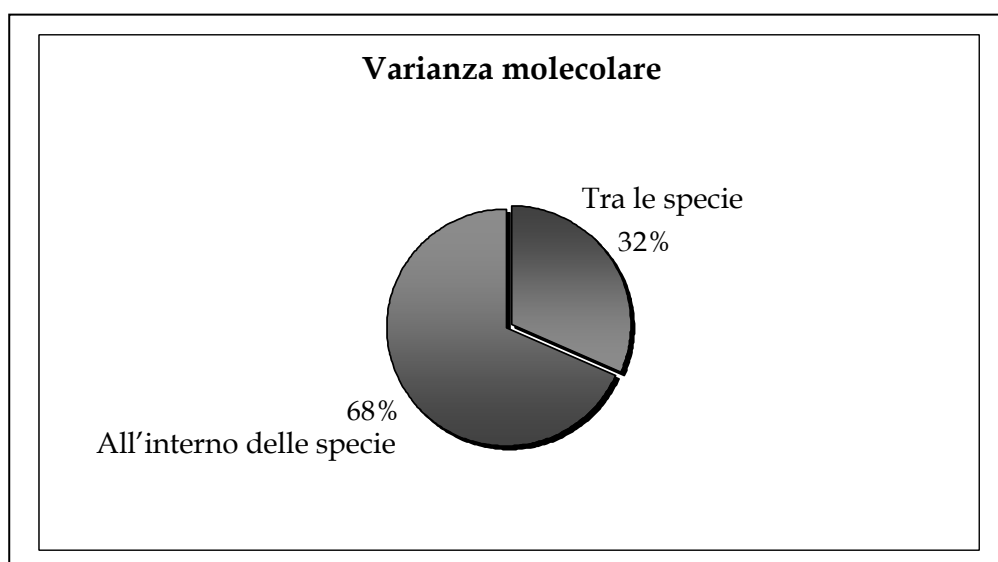


Figura 16. Analisi della varianza molecolare riscontrata tra le specie esaminate ed all'interno di esse.

Tabella 16. Matrice delle distanze genetiche di Nei ( $\alpha$ ) e dell'identità genetica di Nei ( $\beta$ ).

**$\alpha$**

**Matrice delle distanze genetiche di Nei**

<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>	<i>S. politisii</i>	<i>S. apulica</i>	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	
0,000						<i>S. parviflora</i>
0,066	0,000					<i>S. lingua</i>
0,249	0,170	0,000				<i>S. politisii</i>
0,224	0,156	0,097	0,000			<i>S. apulica</i>
0,281	0,214	0,097	0,180	0,000		<i>S. vomeracea</i>
0,154	0,135	0,195	0,252	0,155	0,000	<i>S. cordigera</i>

**$\beta$**

**Matrice dell'identità genetica di Nei**

<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>	<i>S. politisii</i>	<i>S. apulica</i>	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	
1,000						<i>S. parviflora</i>
0,937	1,000					<i>S. lingua</i>
0,780	0,844	1,000				<i>S. politisii</i>
0,799	0,856	0,907	1,000			<i>S. apulica</i>
0,755	0,807	0,908	0,835	1,000		<i>S. vomeracea</i>
0,858	0,874	0,823	0,777	0,857	1,000	<i>S. cordigera</i>



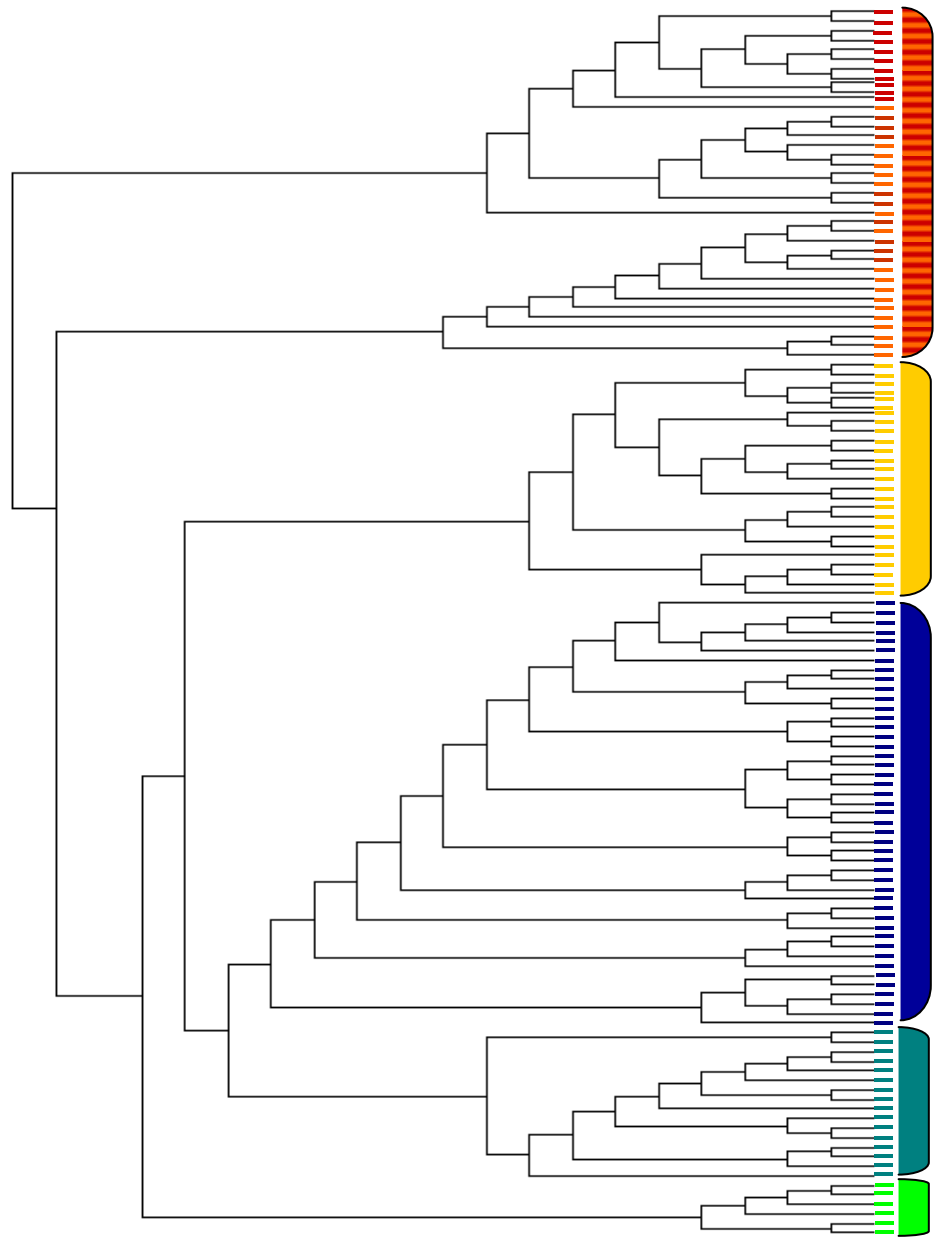


Figura 17. Albero NJ ottenuto dall'analisi dei dati degli AFLP per sei specie del genere *Serapias*:

- *S. lingua*
- *S. parviflora*
- *S. politisii*
- *S. vomeracea*
- *S. cordigera*
- *S. apulica*

## Discussione

### Filogenesi

Le indagini molecolari filogenetiche hanno fornito precise indicazioni sulla naturale suddivisione del genere in due principali gruppi, che includono, a loro volta, due gruppi minori. Ciascuno di essi comprende una sola specie a larga diffusione (*S. parviflora*, *S. lingua*, *S. vomeracea* e *S. cordigera*) insieme a specie rare e/o endemiche con areale ristretto. Inoltre, per la prima volta è stato ottenuto un albero in cui si risolvono completamente le relazioni tra le specie esaminate e, in alcuni casi, si evidenziano strette affinità tra coppie di specie, come nel caso di *S. cordigera*/*S. perez chiscanoi* e di *S. lingua*/*S. gregaria*.

La separazione delle popolazioni di *S. politisii* in due gruppi, sulla base della loro appartenenza alla zona Italiana o Greca dell'areale della specie, suggerisce intriganti ipotesi sulla loro origine e/o storia biogeografica che meritano di essere brevemente commentate. In particolare, la presenza nelle popolazioni Italiane e Greche di un aplotipo esclusivo, paragonabile rispettivamente a quello di *S. parviflora* e *S. vomeracea*, sostiene la possibilità che *S. politisii* sia un ibrido omoploide, così come inizialmente proposto su base morfologica (Renz, 1928). Inoltre, la loro precisa ripartizione geografica potrebbe essere la testimonianza di un duplice evento di ibridazione avvenuto in ciascuna delle due zone dell'areale. In alternativa, le attuali popolazioni di *S. politisii* potrebbero derivare dalla frammentazione di una popolazione ancestrale, non necessariamente di origine ibrida, ed aver quindi o acquisito parte di un polimorfismo originale o subito eventi successivi di introgressione. L'ipotesi della frammentazione è sostenuta da recenti studi di sedimentologia marina che suppongono l'esistenza di un collegamento terrestre tra la penisola Salentina e le coste ioniche della

Grecia, una condizione che giustificherebbe la stretta affinità molecolare trovata anche tra le popolazioni di *Orchis palustris* presenti sulle coste opposte del canale di Otranto (Musacchio *et al.*, 2006).

In contrasto con il polimorfismo plastidiale trovato nell'endemica ristretta *S. politisii*, nessuna variazione è stata osservata nelle specie a maggiore diffusione, quella di *S. vomeracea*, suggerendo la bassa potenzialità di queste regioni plastidiali per indagini filogeografiche.

La suddivisione su base molecolare è differente, da quelle formulate in precedenza nelle due trattazioni sistematiche di Baumann e Künkele (1989) e di Delforge (1994), basate, entrambe, sulle caratteristiche morfologiche del genere. Secondo Baumann e Künkele il genere può essere distinto in due sezioni, *Serapias* e *Bilamellaria*, sulla base della forma del callo posto alla base dell'ipochilo. In particolare, la sezione *Serapias* comprende la sola *S. lingua*, dotata di un callo unico, mentre tutte le altre specie sono poste nella sez. *Bilamellaria* per via del callo bipartito. Inoltre, come precisato dagli autori, le "relazioni naturali" tra le specie della sezione *Bilamellaria* sono espresse dalla suddivisione in tre sottosezioni, *Platypetalae*, *Mediopetalae* e *Stenopetalae*, distinte in base della larghezza del petalo (labello). Le specie riconosciute da Baumann e Künkele sono 17 e la loro ripartizione nelle tre sottosezioni è indicata nella tabella 17.

La trattazione di Delforge (1994) annovera, invece, 26 specie suddivise nei gruppi di *S. parviflora*, di *S. vomeracea* e di *S. lingua* (Tab. 18) individuati in base alla variazione morfologica complessiva dei numerosi tratti fiorali considerati.

In particolare, delle 14 specie considerate nella nostra indagine filogenetica 12 corrispondono ai taxa trattati da Baumann e Künkele (1989), che indicano *S. apulica* come sottospecie di *S. orientalis* e *S. perezchiscanoi* come *S. viridis*, e tutte sono incluse nei tre gruppi suggeriti da Delforge (1994).

Tabella 17. Classificazione del genere *Serapias*  
secondo Baumann & Künkele (1989).

Sezione	Sottosezione	Specie	Sottospecie
<i>Serapias</i>		<i>S. lingua</i>	
<i>Bilamellaria</i>			
	<i>Platypetalae</i>	<i>S. orientalis</i>	<i>orientalis</i> <i>apulica</i> <i>carica</i>
		<i>S. cycladum</i>	
		<i>S. lorenziana</i>	
		<i>S. cordigera</i>	
	<i>Mediopetalae</i>	<i>S. levantina</i>	
		<i>S. feldwegiana</i>	
		<i>S. ionica</i>	
		<i>S. neglecta</i>	
		<i>S. vomeracea</i>	<i>vomeracea</i> <i>longipetala</i>
		<i>S. viridis</i>	
		<i>S. nurrica</i>	
		<i>S. olbia</i>	
	<i>Stenopetalae</i>	<i>S. parviflora</i>	
		<i>S. bergoni</i>	
		<i>S. strictiflora</i>	
		<i>S. politisii</i>	



Rispetto a queste trattazioni, l'albero filogenetico delle sequenze plastidiali fornisce nuovi punti di vista sulle relazioni tra le specie e, quindi, sull'effettivo valore sia dei caratteri morfologici qualitativi sia della variazione quantitativa dei caratteri fiorali.

In primo luogo, l'individuazione di chiare affinità molecolari tra *S. lingua*, *S. gregaria* e *S. olbia*, suggerisce che la suddivisione in due sezioni, fatta da Baumann e Künkele (1989) sulla base del callo unico, appare artificiosa. In tal senso, merita di essere sottolineato il fatto che *S. lingua* e *S. olbia* sono taxa poliploidi, con numero cromosomico rispettivamente di 72 e 108 (Venhuis *et al.*, comunicazioni personali), mentre non è noto il corredo cromosomico di *S. gregaria*, un endemismo della stessa regione di *S. olbia* e considerato da Delforge (1994) di probabile origine ibrida. Pertanto, appare ragionevole ipotizzare, che il carattere callo unico, più o meno solcato in accordo alla descrizione da Delforge (1994), potrebbe rappresentare una modificazione legata all'acquisizione di corredi poliploidi, piuttosto che una tappa iniziale della diversificazione di *Serapias*. Nello stesso tempo, è interessante notare che queste tre specie sono state incluse da Delforge (1994) nel gruppo di *S. lingua* insieme a *S. strictiflora* e *S. stenopetala*, due specie che molecolarmente affini a *S. parviflora*.

Un altro gruppo ben identificato su base molecolare è il gruppo di *S. cordigera*, la cui stretta affinità con *S. perez chiscanoi* e *S. nurrica* non è stata in precedenza mai considerata. Infatti, le tre specie o erano state separate da Baumann e Künkele (1989) nelle sottosezioni *Platy-* e *Mediopetalae* o erano state inserite nel vasto gruppo di *S. vomeracea* da Delforge (1994). Pertanto, le sequenze plastidiali riescono ad individuare relazioni e/o divergenze genetiche all'interno di gruppi di specie in modo più preciso ed approfondito di quanto consentono minime e spesso sovrapponibili variazioni morfologiche dei caratteri fiorali.

Tuttavia, se si considera la composizione dei due gruppi principali ottenuti dalle analisi molecolari, si nota che le specie del gruppo A erano state poste da Delforge (1994) nei gruppi di *S. lingua* e *S. parviflora*, mentre le specie del gruppo B, con l'eccezione di *S. nurrica*, erano state incluse nel gruppo di *S. vomeracea* (Tab. 18). Di conseguenza, esiste a questo livello una corrispondenza tra la dimensione media dei caratteri fiorali e la variazione molecolare, in quanto le specie del gruppo A sono caratterizzate da fiori con tratti diagnostici dalle dimensioni minori, mentre le specie del gruppo B sono quelle con tratti fiorali dalle dimensioni maggiori. (Fig. 18). Le uniche eccezioni sono rappresentate dal caso di *S. politisii*, di cui si è già discusso, e da *S. olbia*, specie esaploide, che ha la larghezza del sepalò e del petalo pari a quella delle altre specie del gruppo B, mentre la lunghezza del labello e del sepalò tipiche del gruppo A.

L'individuazione di questa corrispondenza suggerisce che la variazione delle dimensioni fiorali e, quindi, i meccanismi di isolamento florale possano avere avuto un ruolo al momento della divergenza dei gruppi principali. La presenza nel gruppo con fiori più piccoli di *S. parviflora*, che è specie autogama, rende plausibile l'ipotesi che una riduzione del fiore possa essersi verificata proprio in concomitanza dell'acquisizione di questo tipo di riproduzione sessuata. Infatti, è stato documentato in varie famiglie di angiosperme (Elle & Carney, 2003 e referenze ivi riportate), comprese le Orchidaceae (Richards, 1982). che taxa autogami hanno fiori di dimensioni ridotte rispetto ai taxa affini con riproduzione allogama

Per contro, la speciazione avvenuta in ciascun sottogruppo, potrebbe essere stata guidata anche da meccanismi diversi dall'isolamento florale, dal momento che questi comprendono specie con tratti fiorali delle stesse dimensioni. In tal senso, è possibile formulare per ora solo alcune ipotesi di lavoro, meritevoli di future indagini specifiche. Ad esempio, fenomeni

di speciazione per poliploidia, potrebbero aver determinato la separazione del gruppo di *S. lingua*, dal momento che questa specie è tetraploide e *S. olbia* è esaploide. Oppure, fenomeni di isolamento geografico e/o deriva genetica potrebbero essere stati responsabili della speciazione nei gruppi di *S. vomeracea* e *S. cordigera*.



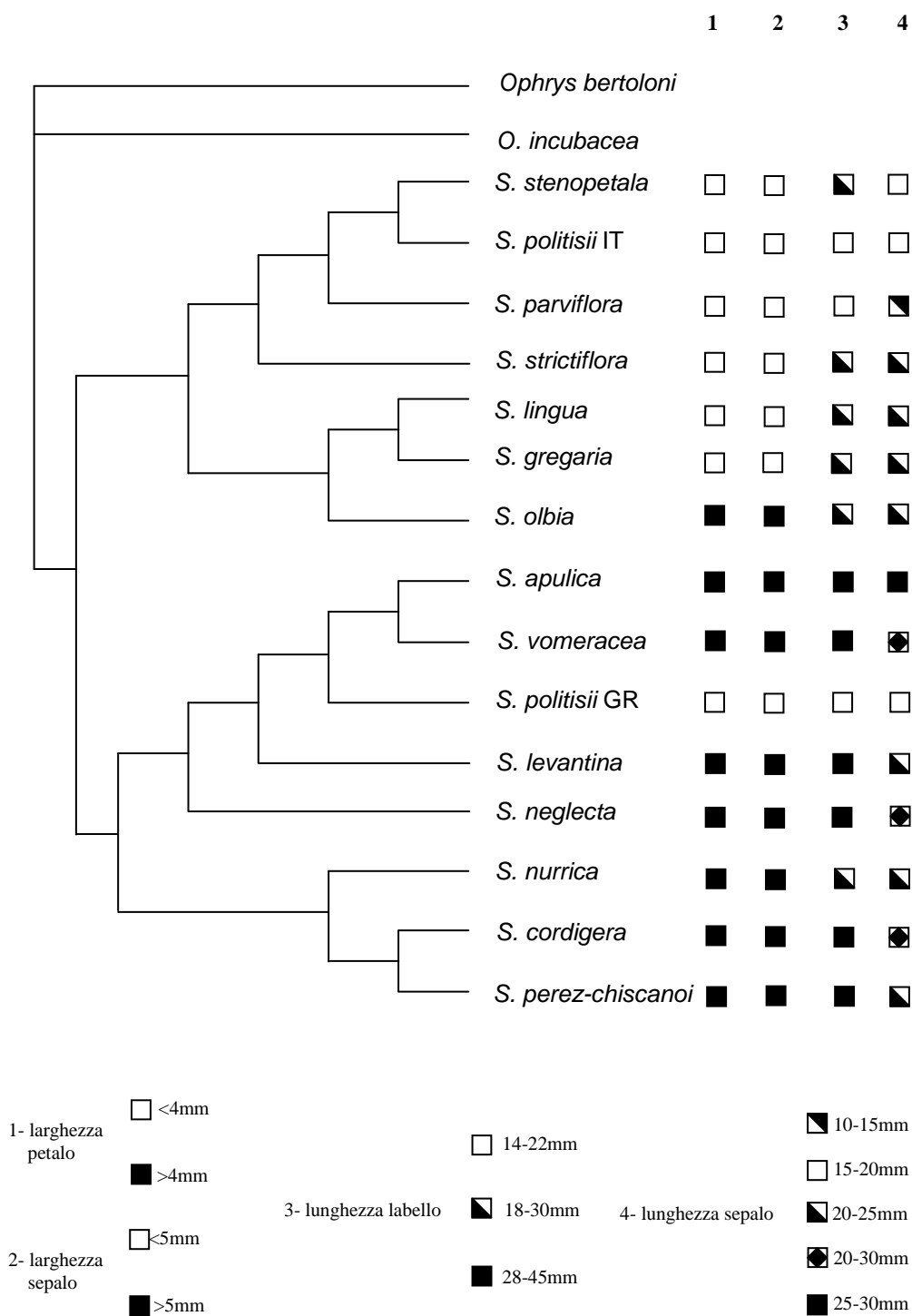


Figura 18. Corrispondenza tra le dimensioni di alcuni tratti fiorali e le relazioni filogenetiche per le 14 specie del genere *Serapias* esaminate.

## Processi demografici

### *Biologia della riproduzione*

Sebbene le specializzazioni fiorali e ancor più le strategie riproduttive delle orchidee decettive favoriscano l'impollinazione incrociata, numerosi casi di specie autogame sono stati ben documentati (Tremblay *et al.* 2005). Gli esperimenti di incroci manuali condotti su sei specie di *Serapias*, hanno dimostrato che *S. parviflora* è l'unica in grado di formare capsule con semi vitali per autogamia spontanea.

Gli incroci intraspecifici hanno evidenziato che *S. vomeracea* e *S. cordigera* sono entrambi autocompatibili, perciò, pur potendo realizzare l'autogamia spontanea, le due specie preferiscono la riproduzione incrociata per opera degli insetti. Ne consegue che la scarsa produzione di frutti riscontrata in natura, è dovuta alla limitazione della disponibilità degli impollinatori (Pellegrino *et al.*, 2005a).

Il motivo per cui le piante ricorrono alla riproduzione incrociata è stato unanimemente indicato nella depressione da incrocio (inbreeding depression) che si manifesta nella progenie. Questo effetto negativo è stato evidenziato in *S. vomeracea* e in *S. cordigera* già a livello della formazione degli embrioni e della capacità germinativa dei semi ottenuti per auto e geitonogamia. (Fig. 11), come attestano i crescenti valori positivi di  $\delta$  (coefficiente di inbreeding). Un andamento simile è stato di recente evidenziato in due orchidee non nettarifere, *Barlia robertiana* ed *Anacamptis morio* (Smithson, 2006), con valori di  $\delta$  che aumentano da 0.2-0.3 (presenza embrione) a 0.7-0.8 (germinabilità).

Tremblay *et al.* (2005) hanno suggerito che questa è una tendenza generale nelle orchidee, come dimostrato in letteratura, da dati riguardanti circa 80 specie, per le quali la produzione media di capsule (71.6%) e di semi con embrione prodotti (40.8%) da autoincroci è inferiore a quella degli alloincroci (80.8% e 64.6%, rispettivamente). Tuttavia, in un certo numero di casi è emerso che la fitness ottenuta per

autogamia può essere pari o maggiore a quella per allogamia (Tremblay *et al.*, 2005). Inoltre, il coefficiente di inbreeding calcolato sia per le orchidee che offrono ricompensa sia per quelle decettive si è dimostrato nella maggior parte delle specie positivo (Smithson, 2006 e referenze ivi riportate) dimostrando che né il segno né il valore del  $\delta$  può essere messo in relazione con la strategia dell'impollinazione.

Gli incroci interspecifici tra *S. vomeracea* e *S. cordigera* hanno evidenziato che esiste un'interessante differenza tra la fitness di tali incroci e quella degli incroci intraspecifici. In particolare, è emerso che la germinabilità dei semi degli incroci interspecifici è significativamente maggiore di quella degli incroci intraspecifici, laddove non sono significativamente differenti la produzione di capsule e la percentuale di semi con embrioni vitali. Questo risultato, apparentemente contraddittorio, può essere spiegato invocando la presenza di barriere riproduttive intraspecifiche, innescate da effetti pleiotropici dovuti a polimorfismi intraspecifici, com'è stato osservato in incroci manuali tra fenotipi di diverso colore dell'orchidea decettiva *Dactylorhiza sambucina* (Pellegrino *et al.*, 2005b).

Nel complesso, gli incroci tra le specie di *Serapias* hanno evidenziato che nessuna di esse ha acquisito un pieno isolamento riproduttivo. Inoltre, differenti livelli di fitness sono stati osservati tra le varie coppie di specie, suggerendo che differenti gradi di divergenza genetica potrebbero essersi instaurati tra queste specie, la cui origine recente è stata ipotizzata anche a causa della loro bassa diversità di sequenze nucleari.

Inoltre, se si considera una determinata coppia di specie si osserva che la fitness riproduttiva varia a seconda della specie donatrice o ricevente il polline, il che implica una diversa capacità di riconoscimento e di accettazione del polline da parte di ciascuna specie.

Tuttavia, non è stata individuata alcuna corrispondenza tra le variazioni del successo riproduttivo e l'appartenenza delle specie ad uno dei gruppi molecularmente individuato dall'analisi filogenetica. Pertanto,

ancora una volta la sola dimensione fiorale non è responsabile e non esprime il grado di isolamento tra le specie, stimolando indagini per la individuazione di altri tipi di barriere pre e/o postzigotiche.

### *Struttura genetica delle popolazioni mediante microsatelliti*

Le popolazioni del gruppo di *S. vomeracea* delle tre sottospecie esaminate sono caratterizzate da un basso numero di alleli, da valori medio/alti di eterozigosità e da frequenti deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Questi tre taxa, inoltre, esibiscono livelli comparabili di variabilità genetica, pur essendo taxa caratterizzati da differenti estensioni dei loro areali, una tendenza osservata anche in altre specie affini (Gitzendammer & Soltis, 2000). Il numero di alleli dei loci microsatelliti di *Serapias* è più basso (4-10) di quello riportato finora per altre specie di orchidee, quali *G. conopsea* (8-14) e *Ophrys* spp. (18-59).

Uno degli scopi delle indagini con i microsatelliti era quello di testare gli eventuali effetti di forze stocastiche evolutive e per questo scopo sono stati applicati metodi che usano dati genetici per determinare la recente storia demografica di una popolazione attraverso un solo campionamento. Questi metodi hanno fornito, per quanto riguarda *Serapias*, indicazioni che processi stocastici e precisamente bottleneck e drift genetico potrebbero aver contribuito a modellare la struttura genetica osservata. Infatti, la maggior parte delle popolazioni ha mostrato una diversità genetica osservata più alta di quella attesa in conformità al TPM, indicando che queste potrebbero aver subito una recente diminuzione delle loro dimensioni. Tuttavia, questo risultato dovrebbe essere guardato con cautela dal momento che le popolazioni esaminate non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg e fenomeni quali non random mating, presenza di sottostrutturazione e recenti migrazioni potrebbero essere responsabili della loro struttura genetica (Cornuet & Luikart, 1996).

Comunque, sono stati trovati bassi valori di  $N_e$ , che indicano le piccole dimensioni effettive delle popolazioni esaminate (Beerly & Felsenstein, 1999), implicando che il numero di individui adulti riproduttivamente validi è basso e che, quindi, il drift genetico e la selezione possano essere favoriti insieme alla loro influenza relativa sulla differenziazione della popolazione. In effetti, le differenze rilevate a livello dei loci SSR tra le popolazioni di *S. vomeracea* sono dovuti più alle variazioni delle frequenze alleliche che dalla presenza di alleli privati riflettendo pertanto proprio l'azione del drift (Ellstrand & Elam, 1993). In questo, *Serapias* presenta tratti comuni ad altre specie di orchidee nelle quali è stata vista l'importanza del bottleneck e del drift genetico nel determinare la struttura genetica della popolazione e l'evoluzione di linee evolutive (Tremblay *et al.*, 2005).

In ogni caso, l'azione di questi due fattori stocastici è fondamentalmente equilibrata dal flusso genico. Sotto questo aspetto le specie outcrossing hanno un'elevata dispersione di semi e di polline e sono caratterizzati da bassi coefficienti di inbreeding e da limitata differenziazione tra le popolazioni a livello di loci neutrali. Le orchidee sono tipicamente outcrossing esibendo un più o meno efficiente flusso di polline in dipendenza del comportamento degli impollinatori, che può essere sia altamente mobile e, finanche, migratorio o quasi stazionario (Proctor *et al.*, 1996). Viceversa, i semi sono minuti, abbondanti, adatti ad essere trasportati dal vento e, quindi, particolarmente capaci di dispersione a lunga distanza (Arditti & Ghani, 2000).

Nel nostro caso, sebbene le popolazioni delle sottospecie *orientalis* e *laxiflora* siano rare e più distanti tra loro di quelle della più diffusa sottospecie *vomeracea*, è stata osservata una bassa differenziazione ( $F_{ST}$ ) tra le popolazioni di ssp. *orientalis* e valori simili tra le quelle di *laxiflora* e *vomeracea*. Inoltre la differenziazione genetica tra ciascuna coppia di popolazioni è variabile e indipendente dalla loro vicinanza geografica.

Infine, la mancanza di un significativo effetto dell'isolamento per distanza indica che le popolazioni possono essere fondate a caso su grande distanza geografica o che il polline può essere disperso a lungo raggio.

Un altro fattore che ha grande influenza sulla struttura genetica della popolazione, è la strategia di impollinazione che nelle orchidee è particolarmente specializzata e può produrre coerenti pattern genetici. Ad esempio, le specie che offrono nettare mostrano, di solito, valori più alti del coefficiente di inbreeding ( $F_{IS}$ ) perché gli insetti tendono a visitare più volte la stessa infiorescenza, come osservato in *G. conopsea* (Gustafsson, 2000). Viceversa, le specie che non offrono ricompensa dovrebbero esibire valori più bassi di  $F_{IS}$  e bassa differenziazione tra le popolazioni perché gli insetti tendono ad allontanarsi velocemente dalla pianta e dalla popolazione visitata, un trend confermato in *Ophrys* (Soliva & Widmer, 2003).

La strategia di impollinazione di *Serapias* dovrebbe promuovere l'outcrossing a livello di popolazione perché gli insetti raramente insistono su un dato fiore o pianta, ma piuttosto li utilizzano occasionalmente come rifugio (Dafni *et al.*, 1981). Tuttavia, poiché *Serapias* utilizza più specie di insetti impollinatori, la struttura dell'evoluzione delle sue popolazioni può essere influenzata dalla differente composizione e comportamento della fauna di impollinatori disponibile in ciascuna località.

Perciò le specie di *Serapias* potrebbero subire in funzione delle variazioni spazio-temporali degli impollinatori variabili regimi selettivi (Ollerton, 1996) ed essere esposte a fenomeni di incrocio non casuale, in particolare una riproduzione assortativa-negativa.

## Amplified Fragment Length Polymorphisms

Le indagini preliminari sinora condotte mediante AFLP danno indicazioni incoraggianti sulla possibilità del loro impiego sia per approfondire analisi di tipo filogenetico, sia per nuovi studi a livello popolazionistico. Infatti, mentre le regioni nucleari sinora analizzate mostrano un'elevata l'omologia di sequenza e non sono perciò utili per le indagini filogenetiche, gli AFLP hanno già fornito un primo albero NJ sia pure per un numero inferiore di specie, e mancante di outgroup. Il confronto tra nucleare e plastidiale potrebbe dare, nel contempo, un valido apporto alla comprensione della possibile evoluzione reticolata presente nel genere.

Per quanto riguarda gli studi popolazionistici, gli AFLP metterebbero in risalto una quantità di informazioni di gran lunga maggiore rispetto agli SSR, dando vita a due principali applicazioni. In primo luogo si potrebbe pensare ad un aspetto puramente tassonomico, dove nozioni di tipo molecolare potrebbero supportare, contrastare o semplicemente chiarire la posizione di alcuni taxa rispetto ad altri. D'altro canto, l'uso degli AFLP potrebbe essere indicato anche per l'identificazione di fenomeni di ibridazione e di introgressione in popolazioni di specie simpatiche.

## Considerazioni conclusive

Le ricerche condotte nel corso del Dottorato hanno fornito, nel complesso, un importante contributo per la delucidazione delle problematiche sistematico-evolutive del genere *Serapias*, poiché sono state acquisite importanti informazioni, che offrono nuovi punti di vista e, nello stesso tempo, contengono interessanti elementi di riflessione e stimolo per indagini future.

Il risultato più rilevante è rappresentato, sicuramente, dall'aver ottenuto un albero filogenetico che ha rivelato insospettate relazioni o divergenze tra le specie esaminate.

Questi dati permettono di impostare in modo più consapevole le ricerche future, come quelle riguardanti lo studio dei processi di speciazione che, in questo genere, sembrano ancora incipienti, ma confermano, anche, che in *Serapias* la variabilità molecolare è particolarmente bassa. Per esempio, nel genere *Ophrys* la variabilità dei frammenti plastidiali non codificanti del *trnL* e del *trnL-F* è pari al 5,3% (Soliva *et al.*, 2001) contro lo 0,3% riscontrato in *Serapias* nei medesimi tratti. Inoltre, il caso di *S. politisii* suggerisce che potrebbe esistere in *Serapias* una più diffusa evoluzione reticolata, la cui reale consistenza potrà essere valutata solo dal confronto tra l'albero filogenetico plastidiale ed uno ottenuto con marcatori molecolari nucleari potenzialmente molto variabili, quali gli AFLP, di recente usati anche per analisi filogenetiche (Després *et al.*, 2003).

La bassa variabilità molecolare osservata è giustificata dall'elevata fertilità interspecifica osservata con le indagini sul sistema di ricombinazione e sul successo riproduttivo intra- ed interspecifico. In particolare, il debole isolamento riproduttivo osservato negli incroci interspecifici indica che un flusso genico può essere ancora frequente in natura, anche perché, è frequente che più specie del *Serapias* vivano in



simpatria. Finora la speciazione delle orchidee è stata comunemente vista, come il risultato di un "isolamento florale", determinato dal comportamento degli impollinatori. Più di recente è stato osservato che le orchidee non nettarifere, qual è *Serapias*, hanno impollinazione non specialistica, che favorisce fenomeni di ibridazione. Tuttavia, poiché gli sciami ibridi sono rari, è stato dedotto che debbano essere attive barriere post-zigotiche dovute a riarrangiamenti cromosomici che, riducendo la fitness, permettono l'isolamento riproduttivo in popolazioni simpatriche (Cozzolino *et al.*, 2004). Alla luce di queste teorie, i risultati delle nostre indagini contengono interessanti implicazioni perché si pongono in contrasto con l'ipotesi delle barriere post-zigotiche dal momento che i semi ibridi hanno un elevato tasso di germinazione e, nello stesso tempo, la bassa variabilità molecolare suggerisce che l'isolamento florale è scarso. Questo pone in primo piano la necessità di meglio comprendere la strategia d'impollinazione e il tipo di barriere riproduttive realmente attive in questo genere, in cui una sia pur relativamente limitata speciazione si è verificata e sembra tuttora in atto.

Un possibile meccanismo evolutivo è stato suggerito dalle indagini molecolari con marcatori SSR, che hanno evidenziato il ruolo dei fenomeni evolutivi stocastici, quali deriva genetica e/o colli di bottiglia, che possono facilmente verificarsi per via delle caratteristiche demografiche e della particolare strategia dell'impollinazione di *Serapias*. Altri potenziali meccanismi sono quelli connessi alle caratteristiche fenologiche, ai sistemi di ricombinazione e alla poliploidia.

In ogni caso, *Serapias* rappresenta un modello intrigante per indagare sui meccanismi di isolamento riproduttivo e di speciazione tra le orchidee non nettarifere del Mediterraneo.

## Letteratura citata

- Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L., Moretti A., 1999. Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13:67–76.
- Alvarez I., Wendel J.F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29:417–434.
- Arditti J., Ghani A.K.A., 2000. Tansley Review, 110 – Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145:367–421.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., UlrikeCampbell C.S., Donoghue M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82:247–277.
- Bateman R.M., 2001. Evolution and classification of European orchids: insights from molecular and morphological characters. *Journal Europäischer Orchideen*, 33(1):33-119.
- Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W., 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 142:1–40.
- Baumann H., Künkele S., 1989. Die Gattung *Serapias* L. - eine taxonomische übersicht. Mitteilungsblatt Beiträge zur Erhaltung Erforschung heimischer. *Orchideen*, 21:701-946.
- Beerly P., Felsenstein J., 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152: 63-773.
- Buttler K. P., 1986. *Orchideen*. Mosaik Veriag, Munchen.

- Cameron K.M., Chase M.W., Whitten W.M., Kores P.J., Jarrell D.C., Albert V.A., Yukawa T., Hills H.G., Goldman D.H., 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 86: 208–224.
- Chase, M.W., Barrett, R.L., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In Dixon, K.M. (Ed.): Orchid conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Cornuet J.M., Luikart G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Cozzolino S., D'Emérico S., Widmer A., 2004. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity *Proceedings Biological Sciences*, 271:259-262.
- Dafni A., Ivri Y., Brantjes N.B.M., 1981. Pollination of *Serapias vomeracea* Briq. (Orch.) by imitation of holes for sleeping solitary male bees (Hym.). *Acta Botanica Neerlandica*, 30:69-73.
- D'Emérico S., Pignone D., Scrugli A., 2000. Giemsa C-banded karyotypes in *Serapias* L. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133:485-492.
- Del Prete C., Tosi G., 1988. Orchidee spontanee d'Italia. Ed Mursia.
- Delforge P., 1994. Guide des Orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient. Delachaux et Niestlé S.A., Lausanne (Switzerland) – Paris.
- Després L., Gielly L., Redoutet B., Taberlet P., 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 185–196.

- 
- Dodd M.E., Silvertown J., Chase M.W., 1999. Phylogenetic analysis of trait evolution and species diversity variation among angiosperm families. *Evolution* 53:732-744.
  - Doyle J.J., 1991. DNA protocols for plants - CTAB total DNA isolation, pp.: 283-293. In: Hewitt G.M., Johnston A. (Eds.), *Molecular techniques in taxonomy*. Springer - Verlag, Berlin, Germany.
  - Dressler R.L., 1993. *Phylogeny and Classification of the Orchid family*, Cambridge University Press.
  - Elle E., Carney R., 2003. Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 90:888-896.
  - Ellstrand L.C., Elam D.R., 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 24: 217-242.
  - Felicioli A., Strumia F., Filippi L., Pinzauti M., 1998. Observations on the relation between orchids of the genus *Serapias* and their pollinators in an area of central tuscany. *Frustula entomologica*, 21:103-108.
  - Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
  - Gielly L., Taberlet P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11:769-777.
  - Gitzendammer M.A., Soltis P.S., 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87:783-792.
  - Gölz P., Reinhard H.R., 1980. *Serapias*. Ergebnisse statistischer u chronologischer Untersuchungen. AHO Baden-Württemberg, 12:123-189.

- 
- Grant V., 1949. Pollination system as isolation mechanisms in angiosperm. *Evolution*, 3:82–97.
  - Grünanger P., 2001. Orchidacee d'Italia. *Quaderni di Botanica ambientale ed applicata*, 11:3-80.
  - Gustafsson S., 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology*, 9:1863-1872.
  - Gustafsson S., Thorén P.A., 2001. Microsatellite loci in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology Notes*, 1:81–82.
  - Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95–98.
  - Hamilton M.B., 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8:513–525.
  - Hartl D.L., Clark A.G., 1989. Principles of population genetics, 2nd edition. Sunderland, MA: Sinauer.
  - Hedrén M., Fay M.F., Chase M.W., 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 88: 1868–1880.
  - Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C. et al., 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Molecular Genetics*, 217:185-194.
  - Johnston M.O., Schoen D.J., 1994. On the measurement of inbreeding depression. *Evolution*, 48:1735-1741.
  - Musacchio A., Pellegrino G., Cafasso D., Widmer A., Cozzolino S., 2006. A unique *A. palustris* lineage across the Otranto strait: botanical

- evidence for a past land-bridge?". *Plant Systematics and Evolution*, in stampa.
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:283–292.
  - Nelson E., 1968. Monographie und Ikonographie der Orchidaceen-Gattungen *Serapias*, *Aceras*, *Loroglossum*, *Barlia*. Chernetz-montreux.
  - Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., Takiuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H., 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 322:572–574.
  - Ollerton J., 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology*, 84:767–769.
  - Oxelman B. M. Lidén, Berglund D., 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 206:393–410.
  - Peakall R., Smouse P., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
  - Pellegrino G., Cafasso D., Widmer A., Soliva M., Musacchio A., Cozzolino S., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from the orchid *Serapias vomeracea* (Orchidaceae) and cross-priming to other *Serapias* species. *Molecular Ecology Notes*, 1:279-280.
  - Pellegrino G., Gargano D., Noce M.E., Musacchio A., 2005a. Reproductive biology and pollination limitation of *Serapias vomeracea* (Burm.) Briq. (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 20:33-39.
  - Pellegrino G., Bellusci F., Musacchio A., 2005b. A Evidence of post-pollination barrier among three colour morphs of the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina*. *Sexual Plant Reproduction*, 18:179-185.

- Pignatti S., 1982. Flora d'Italia. Edagricole. Bologna.
- Powell W., Machray G.C., Provan J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Elsevier Science, vol. 1, n° 7.
- Pridgeon A.M., Bateman R.M., Cox A.V., Hapeman J.R., Chase M.W., 1997. Phylogenetics of Subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana*, 12: 89-109.
- Proctor M., Yeo P., Lack A., 1996. The natural history of pollination. Harper Collins, London.
- Raymond M.L., Rousset F., 1995. GENEPOP (1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249.
- Renz J., 1928. Zur Kenntnis der griechischen Orchideen. *Feddes Repertorium*, 25:225-270.
- Richards A.J., 1982. The influence of minor structural changes in the flower on breeding system and speciation in *Epipactis* Zinn (Orchidaceae). In: Armstrong J.A., Powell J.M., Richards A.J. (eds.) *Pollination and Evolution*. Royal Botanic Gardens, Sydney, pp. 47-53.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Sanger F.S., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding Natural Academy Science - USA*, 74:5463-5467.
- Shaw J., Lickey E.B, Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA

- sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1):142-166.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M. et al., 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *European Molecular Biology Organization Journal*, 5:2043-2049.
  - Smithson A., 2006. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. *New phytologist*, 169:419-430.
  - Soliva M., Kocyan A., Widmer A., 2001. Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20:78-88.
  - Soliva M., Gautschi B., Salzmann C., Tenzer I., Widmer A., 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. *Molecular Ecology*, 9:2178-2179.
  - Soliva M., Widmer A., 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution*, 57:2252-2261.
  - Sprengel C.K., 1793. Das entdeckte Geheimniss der Natur in Bau und in der Befurchtung der Blumen. F Vieweg, Berlin.
  - Squirrel J., Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Tebbitt M.C., Hollingsworth M.L., 2002. Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 11:1957-1964.
  - Strasburger E., 1982. Trattato di botanica. Parte sistematica. Antonio Delfino Editore. Roma.



- Swofford D.L., 2000. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17:1105-1109.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N., 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84:1-54.
- Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., 1980. Flora Europea. Cambridge University Press.
- Van der Cingel N.A., 1995. An Atlas of Orchid Pollination. *European Orchids*. A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- Van der Cingel N.A., 2001. Atlas of Orchid Pollination: Orchids of America, Africa, Asia and Australia. A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- Van der Pijl L., Dodson C.H., 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. University of Miami Press Coral Gables, Florida.
- Van Waes J.M., Debergh P.C., 1986. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67:253-261.
- Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P., Morgante M., 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5:595-598.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Weir B.C., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.

- Weising K., Gardner R.C., 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42:9-19.
- Widmer A., Cozzolino S., Pellegrino G., Soliva M., Dafni A., 2000. Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria remains found on insects. *Molecular Ecology*, 9:1911-1914.
- Yeh F.C., Young R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X., 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zelmer C.D., Cuthbertson L., Currah R.S., 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37:439-448.