

Università degli Studi di Palermo  
Anno Accademico 2010/2011

DOTTORATO DI RICERCA  
**AGRO-ECOSISTEMI MEDITERRANEI**  
XXII CICLO S.S.D. BIO02



**CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E GENETICA DI  
POPOLAZIONI DI *CAPPARIS SPINOSA* L. IN SICILIA**

Tutor  
Prof. Silvio Fici

Co - tutor  
Dott. Francesco Carimi

Coordinatore  
Prof.ssa Adriana Bonanno

Dottorando  
Alessandro Silvestre Gristina

Università degli Studi di Palermo

Anno Accademico 2010/2011

DOTTORATO DI RICERCA

**AGRO-ECOSISTEMI MEDITERRANEI**

XXII CICLO S.S.D. BIO02

CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E GENETICA DI  
POPOLAZIONI DI *CAPPARIS SPINOSA* L. IN SICILIA

Tutor

Prof. Silvio Fici

Coordinatore

Prof.ssa Adriana Bonanno

Co - tutor

Dott. Francesco Carimi

Dottorando

Alessandro Silvestre Gristina

*A mio Nonno*

## INDICE

Premessa	pag. 1
<b>1. Introduzione</b>	pag. 2
1.1 La specie indagata: <i>Capparis spinosa</i> L.	pag. 2
1.2 Distribuzione ed ecologia	pag. 6
1.3 Fenologia, impollinazione e dispersione	pag. 9
1.4 Storia della tassonomia del gruppo di <i>Capparis spinosa</i> L.	pag. 11
1.5 Archeobotanica	pag. 13
1.6 Etnobotanica	pag. 15
1.7 Tecniche di caratterizzazione genetica	pag. 16
1.8 Studi genetici su <i>Capparis spinosa</i> L.	pag. 17
<b>2. Obiettivi della ricerca</b>	pag. 18
<b>3. Materiali e metodi</b>	pag. 19
3.1 Nomenclatura adottata	pag. 19
3.2 Area di studio e selezione delle popolazioni	pag. 19
3.3. Metodi di campionamento: raccolta del materiale	pag. 24
3.4 Caratterizzazione morfologica	pag. 25
3.5 Caratterizzazione molecolare PCR-ISSR	pag. 26
<b>4. Risultati</b>	pag. 29
<b>Caratterizzazione morfologica</b>	
4.1 Portamento	pag. 29
4.2 Morfologia fogliare	pag. 32
<b>Caratterizzazione genetica</b>	
4.3 Analisi dei pattern genetici	pag. 38
4.4 Diversità intra- e inter-popolazione	pag. 39
4.5 Analisi delle coordinate principali degli individui	pag. 41
4.6 Analisi delle coordinate principali delle popolazioni	pag. 43
<b>5. Discussioni</b>	pag. 46
5.1 Ecologia e morfologia	pag. 46
5.2 Caratterizzazione genetica	pag. 47
5.3 Ibridi	pag. 48
5.4 Considerazioni tassonomiche e filogenetiche	pag. 48
<b>6. Conclusioni</b>	pag. 50
<b>Ringraziamenti</b>	pag. 51
<b>Bibliografia</b>	pag. 52

## Premessa

Il genere *Capparis* L. è distribuito nel bacino del Mediterraneo e in varie aree tropicali e subtropicali del Vecchio e del Nuovo Mondo.

In Europa è rappresentato da un complesso polimorfo oggi riferito a un'unica specie, *Capparis spinosa* L. (HIGTON & AKEROYD, 1991). Questa mostra un'ampia distribuzione essendo presente con sottospecie e varietà locali in aree geografiche e habitat molto diversi, dalla regione Mediterranea all'Oceania. Questo fa sì che associata a una notevole variabilità ecologica vi sia un'elevata variabilità morfologica che è all'origine della difficile interpretazione tassonomica del gruppo. Diversi autori si sono impegnati nello studio di questa diversità, tentando di descrivere e differenziare su base morfologica le varie entità riferite a questo gruppo, ottenendo però risultati di scarsa chiarezza a causa dell'estrema variabilità fenotipica e della sovrapposizione dei caratteri morfologici, nelle aree di contatto tra le entità intraspecifiche. In queste zone, i confini tra esse sono difficilmente identificabili per la presenza di forme intermedie (ZOHARY, 1960) originatesi dal flusso genico tra i vari taxa (JIMÉNEZ, 1987), che ne rendono difficile l'attribuzione ad una categoria tassonomica.

*C. spinosa* L. è una pianta di grande valore economico per i suoi boccioli fiorali usati come condimento nella cucina mediterranea e per la notevole quantità di principi attivi che contiene. Sin dalle origini della civiltà la specie è stata legata all'uomo per le sue proprietà curative e nutritive, come dimostrano le testimonianze archeologiche.

Il territorio siciliano risulta molto interessante per lo studio di questo gruppo in quanto ospita numerose popolazioni naturali diversificate tassonomicamente ed ecologicamente.

L'obiettivo di questa ricerca è stato la caratterizzazione morfologica e genetica di popolazioni selvatiche e coltivate del gruppo di *Capparis spinosa* L. presenti nell'isola.

Il progetto di ricerca è stato realizzato utilizzando un approccio multidisciplinare che ha compreso l'uso di marcatori molecolari unitamente all'analisi morfologica ed ecologica delle popolazioni selezionate. La caratterizzazione morfologica realizzata su un numero ridotto di caratteri scelti tra quelli più affidabili riportati in letteratura è servita come base di partenza per l'analisi molecolare, che costituisce la parte più originale del lavoro. La genetica del gruppo, infatti, rappresenta un aspetto della problematica fino ad ora inesplorato in Sicilia e poco indagato anche nella restante parte dell'areale.

Il lavoro in sintesi ha mirato a caratterizzare la diversità naturale ed in coltura del gruppo in Sicilia, chiarendo l'inquadramento tassonomico delle due entità presenti, delle forme intermedie e dei biotipi (BARBERA 1993) coltivati a Salina e Pantelleria.

# 1. Introduzione

## 1.1 La specie indagata: *Capparis spinosa* L.

La famiglia delle Capparaceae comprende circa 40-50 generi tropicali, subtropicali e temperati, a cui appartengono circa 700-900 specie (HALL. *et al.*, 2002) arboree, arbustive ed erbacee. Il genere *Capparis* L. include circa 250 specie distribuite nelle regioni tropicali e subtropicali del Vecchio e del Nuovo Mondo (JACOBS, 1965). A questo genere appartengono diverse entità di valore economico, e tra queste vi sono i capperi commerciali, principalmente coltivati o raccolti da piante spontanee nel bacino del Mediterraneo ed in alcuni paesi limitrofi. In Sicilia il cappero, *C. spinosa* L., è ampiamente diffuso allo stato spontaneo ed in coltivazione, e l'isola è rinomata in tutto il mondo per l'eccellente qualità dei boccioli fiorali che vi si producono.

Nell'isola *C. spinosa* è presente con due taxa intraspecifici: la subsp. *spinosa*, principalmente diffusa su regosuoli, suoli bruni e litosuoli all'interno della serie Gessoso-Solfifera e su altri substrati Miocenici di origine sedimentaria come marne e argille (FICI & GIANGUZZI, 1997); la subsp. *rupestris* (Sibth. e Sm.) Nyman, presente in ambienti rocciosi, falesie e rupi, generalmente presso la costa, su calcari compatti Mesozoici, calcari Eocenici e Oligocenici, marne gessi e substrati di origine vulcanica. All'interno della subsp. *spinosa* si distinguono due varietà: la var. *spinosa* piuttosto rara e la var. *canescens* Cosson più comune. L'alto grado di polimorfismo di questa specie è evidente anche in Sicilia. Le due sottospecie, seppur abbiano caratteri altamente variabili, sono nella maggior parte dei casi ben distinguibili quando osservate in popolazioni pure e negli ambienti tipici. I principali caratteri diagnostici distintivi delle due sottospecie sono rispettivamente per la subsp. *spinosa* e la subsp. *rupestris* i seguenti: habitus molto ramificato/ poco ramificato; foglia ovata, obovata, ellittica/ ovata o orbicolare; stipole spinose/ stipole assenti; caduche o vestigiali.

Nelle aree dove le popolazioni delle due entità vengono a contatto, l'identificazione delle due sottospecie diventa problematica, e si nota la presenza d'individui dalla morfologia intermedia tra le due forme, che secondo il recente lavoro di INOCENCIO *et al.* (2006), sarebbero da ricondurre a degli ibridi tra la subsp. *spinosa* var. *canescens* (*Capparis sicula* Veill.) e la subsp. *rupestris* (*Capparis orientalis* Veill.). In queste aree i sopraelencati caratteri diagnostici sono poco efficaci per la determinazione degli esemplari, soprattutto per i fenotipi intermedi. Anche seguendo la chiave analitica proposta da Inocencio INOCENCIO *et al.* (2006), infatti, non è possibile determinarli in modo univoco poiché mostrano una ampia variabilità che rientra alternativamente nell'ambito dell'una o dell'altra sottospecie. Nella chiave e nelle descrizioni non vi è un chiaro riferimento né al tipo di ramificazioni né all'habitat dei taxa che potrebbe renderne più agevole la determinazione.

Un fatto interessante e ancora privo di spiegazione è che individui con fenotipo intermedio vengono osservati sporadicamente anche all'interno di popolazioni apparentemente pure e geograficamente isolate di entrambe le sottospecie, rendendo l'ipotesi dell'ibridazione delle due forme improbabile in questi casi.

Di seguito si riportano le descrizioni di *C. spinosa* subsp. *spinosa* da INOCENCIO *et al.* (2006) e di *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* e *C. spinosa* subsp. *rupestris* modificate da FICI & GIANGUZZI (1997). Vengono anche forniti dati sulla fenologia in Sicilia seguendo FICI & GIANGUZZI (1997).

### *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*

Descrizione: arbusto procombente; rami eretti lunghi fino a 3 m, di colore verde scuro; internodi 1,5 – 3,5 cm; stipole curve, retrorse, non decorrenti, tenere, deboli o vestigiali, raramente robuste, usualmente molto lunghe (3 – 6 mm) e sottili, di colore giallo intenso. Foglie ovate o obovate, 4,5 × 2,5 – 3,5 cm erbacee; indumento molto lasso, tricomi spessi e lunghi precocemente caduchi. Venature delle foglie non prominenti; base della foglia arrotondata e affusolata; apice acuto, mucrone molto piccolo 0,1 – 0,5 mm; picciolo lungo 0,7 – 1 cm. Gemme fiorali acute; pedicello florale spesso e lungo 5 – 6,5 cm; fiori zigomorfici; sepalò posteriore galeato lungo 1,8 – 2,4 cm e largo 0,6 – 1,1 cm; stami numerosi, da 100 a 150, antere 2,5 – 2,8 mm con apice acuto. Frutto oblungo con la polpa rossa; semi a maturità marroni, 3 – 3,2 × 2,6 – 2,8 × 2 – 2,5. Fioritura da Maggio a Ottobre.

### *C. spinosa* L. subsp. *spinosa* var. *canescens* Cosson (Fig. 1)

Descrizione: camefita o emicriptofita con rami striscianti fino a 3 m di lunghezza; rami con numerose ramificazioni, generalmente annuali; getti giovani pubescenti con peluria bianca appressata. Foglie ellittiche-oblunghe, cartacee, 1,2 - 2,9 × (2-) 3 – 4,2 cm, sparsamente pubescenti, con mucrone apicale; picciolo solcato lungo 3-7 mm; stipole spinose, ricurve, lunghe 2 – 5 mm. Fiori più o meno zigomorfici, solitari, ascellari; sepalò posteriore lungo 1,5 – 2,3 cm, saccato, gli altri lunghi 1,3 – 2,2 cm, concavi; petali superiori connati, inferiori liberi, obovati, lunghi 1,8 – 2,7 cm. Stami numerosi con filamenti lunghi 2,5 – 3,5 cm; ginoforo lungo 3 – 4 (-4,4) cm; ovario ovato-ellissoide lungo 3 – 4 mm. Frutto sferoidale, lungo 3 – 4,2 cm, a maturità comunemente apertesi in 3 - 4 costole. Fioritura da Maggio a Settembre.



Fig. 1 Iconografia di *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* (da FICI & GIANGUZZI 1997).

*C. spinosa* L. subsp. *rupestris* (Sibth. e Sm.) Nyman (Fig. 2)

Descrizione: arbusto con rami penduli, lunghi fino a 3 – 4 m, con poche ramificazioni e generalmente perenni. Foglie da ovate a orbicolari, cuoiose, (1,7-) 2 – 4,5 × 2,5 – 6 cm, arrotondate all'apice o retuse, cordate o subcordate/arrotondate alla base; picciolo non solcato lungo 0,4 – 1,7 cm; stipole lunghe 0,8 – 2,4 mm, spesso caduche, setacee o raramente spinose. Fiori leggermente zigomorfi, ascellari, solitari; sepallo posteriore saccato lungo 1,8 – 2,7 cm, gli altri lunghi 1,8 – 2 cm, imbarcati; petali superiori connati, gli inferiori liberi, obovati lunghi 1,8 – 2,5 cm; stami numerosi con filamenti lunghi 2,5 – 4 cm; ginoforo lungo 3,5 – 4,5 cm; ovario strettamente ellissoidale, lungo 3 – 5 mm. Frutto oblungo-ellissoidale, lungo 3,2 – 5 cm, acuto all'apice o apiculato, a maturità comunemente apertesi lungo una costola. Fioritura da Aprile a Settembre.



Fig. 2 - Iconografia di *C. spinosa* subsp. *rupestris* (da FICI & GIANGUZZI 1997).

### Forme coltivate

Per quanto riguarda le forme coltivate di *C. spinosa*, in Sicilia e nelle isole circumsiciliane, esse derivano dalla subsp. *rupestris* (FICI & GIANGUZZI, 1997; RIVERA *et al.*, 1999; RIVERA *et al.*, 2003), nonostante anche in questo ambito vi sia un po' di confusione generata soprattutto dalla presenza di stipole spinose nei biotipi "Spinoso di Pantelleria" (Fig. 3) e "Spinoso di Salina", che taluni autori riferiscono appartenere alla subsp. *spinosa* (RIVERA *et al.*, 2003).

A Pantelleria sono segnalati diversi biotipi coltivati (BARBERA *et al.*, 1991; BARBERA, 1993), con caratteristiche morfologiche differenti soprattutto per quanto riguarda la forma e la consistenza dei boccioli fiorali e la presenza e la consistenza delle stipole. Il biotipo più pregiato e anche più diffuso è la "Nocellara", senza stipole e con boccioli fiorali tondeggianti e pieni; ci sono poi altre forme in via di scomparsa come la "Testa di Lucertola", di scarso pregio per la forma triangolare dei boccioli fiorali dall'apertura precoce, e lo "Spinoso di Pantelleria" che a causa della consistenza coriacea delle stipole risulta poco agevole per la raccolta dei boccioli. Le piante sono propagate in coltura per seme, poiché la propagazione per talea è difficile e comporta un dispendio notevole di acqua, bene prezioso e raro nell'isola.

A Salina si distinguono due biotipi, "Nocella" (Fig. 4) e "Spinoso di Salina". Il primo ha caratteristiche simili alla "Nocellara di Pantelleria" per forma e consistenza dei boccioli fiorali, e per questo è anche il più pregiato e diffuso sull'isola. Le piante di questo biotipo presentano delle stipole spinose dalla consistenza che va dal setaceo allo spinoso. Lo "Spinoso di Salina" invece presenta sempre stipole spinose, e maggior grado di ramificazione. Entrambi i biotipi sono più vigorosi rispetto a quelli di Pantelleria, la propagazione in coltura avviene per talea, ed appaiono poco adattabili ad ambienti diversi e meno resistenti alla siccità (BARBERA, 1993).



Fig. 3: particolare del morfotipo dello "Spinoso di Pantelleria"



Fig. 4: particolare del morfotipo della "Nocella di Salina"

Negli altri paesi dove la coltura del capperò è diffusa, invece è utilizzata principalmente la subsp. *spinosa*. In Spagna, da questa, sono state ricavate numerose varietà (BARBERA, 1993, RIVERA *et al.*, 1999) che sono propagate sia per talea sia da seme e coltivate nelle regioni aride centro meridionali, tra le quali Andalusia, Murcia e Valencia (LUNA LORENTE & PEREZ VICENTE, 1985). Nelle isole Baleari, vi sono tre varietà senza spine

probabilmente riconducibili al gruppo della subsp. *rupestris* (RIVERA *et al.*, 2003): “Fulla Redona” dall'alto rendimento in boccioli fiorali ma poco diffusa, “Cavall” e “Italiana” che mostrano una produzione scarsa, quest'ultima è indicata come proveniente da Pantelleria (LUNA LORENTE & PEREZ VICENTE, 1985). In Marocco la raccolta avviene principalmente da piante spontanee, di diverse specie comunque spinose (BARBERA, 1993), e da alcune coltivazioni esistenti, impiantate con cultivar di *C. zoharyi* (RIVERA *et al.*, 2003) ma la realizzazione di colture intensive è in fase di sviluppo.

## 1.2 Distribuzione ed ecologia

La famiglia delle Capparaceae ha una distribuzione pantropicale, preferenzialmente legata a habitat a clima tropicale stagionale con una stagione secca, e con alcune “disgiunzioni” nelle zone temperate. Il genere *Capparis* comprende specie a distribuzione tropicale e subtropicale nelle regioni del Vecchio e del Nuovo Mondo. Il gruppo di *Capparis spinosa* L. mostra anch'esso un'ampia distribuzione paleo e sub-tropicale, estesa dalle Isole del Pacifico occidentale all'Australia, alla Malesia orientale, all'Asia centrale e meridionale, all'Africa settentrionale e all'Europa meridionale (Fig. 5). I paesi in cui viene riportata la sua presenza sono i seguenti: Afghanistan (KITAMURA, 1964); Albania (HEYWOOD, 1993), Algeria (QUEZÉL & SANTA, 1962); Armenia (BOBROV, 1970); Australia (FICI, 2003); Azerbaijan (BOBROV, 1970); Ciad (OZENDA, 1958); Cina (Xinjiang, Xizang) (MINGLI & TUCKER, 2008); Cipro (MEIKLE, 1977) Egitto (TÄCKHOLM, 1974); Ex - Jugoslavia (HEYWOOD, 1993); Francia (inclusa la Corsica) (HEYWOOD, 1993); Georgia (BOBROV, 1970); Grecia (inclusa Creta) (TAN, 2002); India (KITAMURA, 1964); Indonesia (MINGLI & TUCKER, 2008); Iran (HEDGE & LAMOND, 1970); Iraq (RECHINGER, 1964); Israele (ZOHARY, 1966); Giordania (DANIN, 2010); Libano (MOUTERDE, 1966); Libia (MAIRE, 1965); Malesia (HEDGE & LAMOND, 1970); Marocco (VALDÉS *et al.*, 1996); Nepal (POLUNIN & STANTON, 1984); Pakistan (KITAMURA, 1964); Spagna (comprese Isole Baleari) (MARCOS SAMANIEGO & PAIVA 1993); Siria (MOUTERDE, 1966); Sudan (HEDGE & LAMOND, 1970); Tagikistan (BOBROV, 1970); Tunisia (POTTIER-ALAPETITE, 1979); Turchia (DAVIS, 1984); Turkmenistan (BOBROV, 1970); Penisola Arabica (HEDGE & LAMOND, 1970); Portogallo (HEYWOOD, 1993); Ucraina (Crimea) (HEYWOOD, 1993); Uzbekistan (BOBROV, 1970); Yemen (WOOD, 1997).

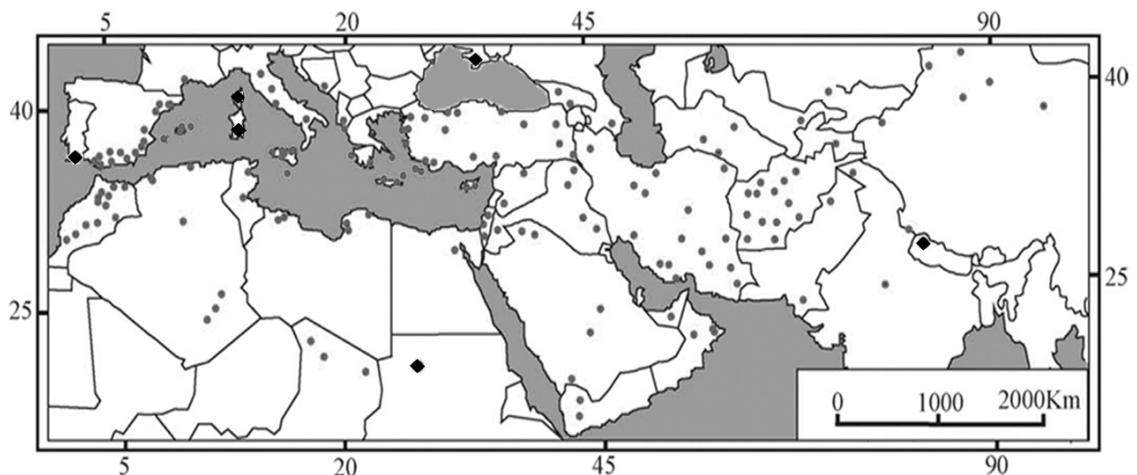


Fig. 5. Distribuzione del gruppo di *C. spinosa* in Eurasia e Nord Africa (● distribuzione secondo Jiang *et al.*, 2007, ◆ modifiche).

Data la vastità dell'areale la specie ha un'elevata plasticità ecologica e fenotipica, ed è presente con sottospecie e varietà locali, in ambienti notevolmente diversi tra loro come le regioni desertiche dello Xinjiang (Fig. 6) o le pareti rocciose di alcune valli Himalayane in Pakistan e Nepal o ancora l'outback australiano.



Fig. 6 *C. spinosa* nella regione desertica dello Xinjiang (Cina). (foto Jang H. E.)

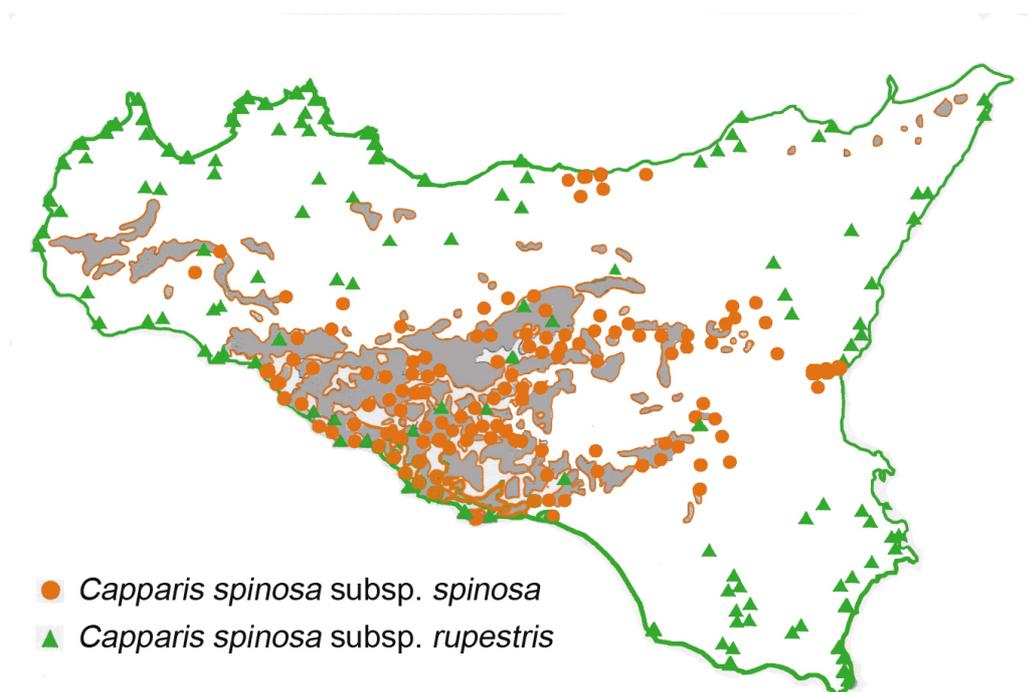


Fig. 7 Distribuzione delle due sottospecie di *C. spinosa* in Sicilia (modificato da FICI, 2001). Le aree in grigio rappresentano gli affioramenti della serie Gessoso-Solfifera.

Le due sottospecie presenti in Sicilia mostrano un'ecologia nettamente differente ed hanno areali sovrapposti nella zona centro-meridionale dell'isola (Fig. 7).

La subsp. *spinosa* si trova su substrati argillosi, ricchi in sali solubili, lungo tutta la serie "Gessoso-Solfifera". La sua distribuzione comprende le aree centrali e meridionali dell'isola estendendosi a Est fino alla Provincia di Catania, con popolazioni disgiunte sulla costa nord nel tratto tra Torremuzza e S. Stefano di Camastra (FICI & GIANGUZZI, 1997). Il suo ambiente tipico è costituito dalle zone pianeggianti e collinari di natura argillosa (regosuoli, suoli bruni, suoli bruni-vertici) diffuse all'interno dell'isola (Fig. 8). Il taxon da un punto di vista fitosociologico è specie caratteristica della classe Pegano-salsoletea Br.-Bl. & O. Bolòs 1958 (ordine dei Salsolo-Peganetalia Br.-Bl. & O. Bolòs 1954, alleanza del Salsolo-Peganion Br.-Bl. & O. Bolòs 1954) (BRULLO *et al.*, 2002). Le formazioni vegetali appartenenti a questa classe sono prettamente alo-nitrofile e particolarmente diffuse nei territori iberico-mauritanici, in stazioni caratterizzate da una marcata aridità edafo-climatica (BRULLO *et al.*, 1985). In Sicilia la specie è caratteristica di diverse associazioni caratterizzate dalla presenza di specie alofite e d'importanti entità endemiche quali *Limonium catanzaroi* Brullo e *Salsola agrigentina* Guss. (BRULLO *et al.*, 1985), particolarmente adattate alla ricchezza in sali del substrato. Secondariamente si ritrova, sempre nell'aria della serie "Gessoso-Solfifera", ai bordi delle strade, in zone antropizzate e degradate (discariche, massicciate ferroviarie, ecc.), oltre che come infestante delle colture arboree ed erbacee. Sporadicamente individui di questa sottospecie si rinvencono anche su litosuoli ed in ambienti rocciosi (alla base delle rupi, su detriti gessosi, muri ecc.). Queste stazioni sono nella maggior parte dei casi in zone di contatto con la subsp. *rupestris*, all'interno della serie "Gessoso-Solfifera", dove vi sono affioramenti calcarei e/o gessosi a contatto con le argille. Gli individui sono caratterizzati da una morfologia intermedia tra le due forme, non formano mai popolazioni estese ed isolate ma si rinvencono sempre all'interno o nelle adiacenze di popolazioni delle due sottospecie. Questi individui sarebbero da considerare secondo INOCENCIO *et al.* (2006) come ibridi derivanti dall'incrocio tra la subsp. *spinosa* var. *canescens* (*C. sicula* Veill.) e la subsp. *rupestris* (*C. orientalis* Veill.).

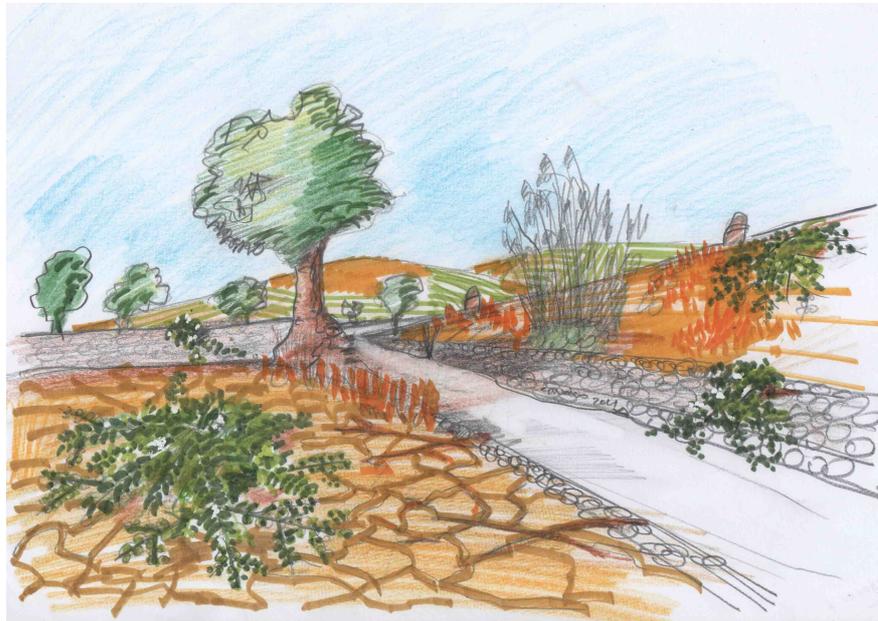


Fig. 8 Habitat di *C. spinosa* subsp. *spinosa*. (ill. Giorgio Gristina)

La subsp. *rupestris* è diffusa su gran parte del territorio in stazioni dove risulta localmente abbondante e in stazioni più puntiformi, mentre è assente dalle zone montuose

delle Madonie e Nebrodi e le zone elevate dell'Etna. La pianta ha un'ecologia rupestre di tipo casmo-nitrofilo, predilige le rupi aride, i luoghi rocciosi (Fig. 9), cresce secondariamente anche in ambienti antropizzati come vecchi muri di strade ed edifici, muretti a secco e bordi dei campi (soprattutto nelle isole), e prospera in gran parte dei siti archeologici. Colonizza ambienti rupestri (e semirupestri) su substrati calcarei, calcareo - marnosi, vulcanici e anche gessosi, generalmente presso la costa.

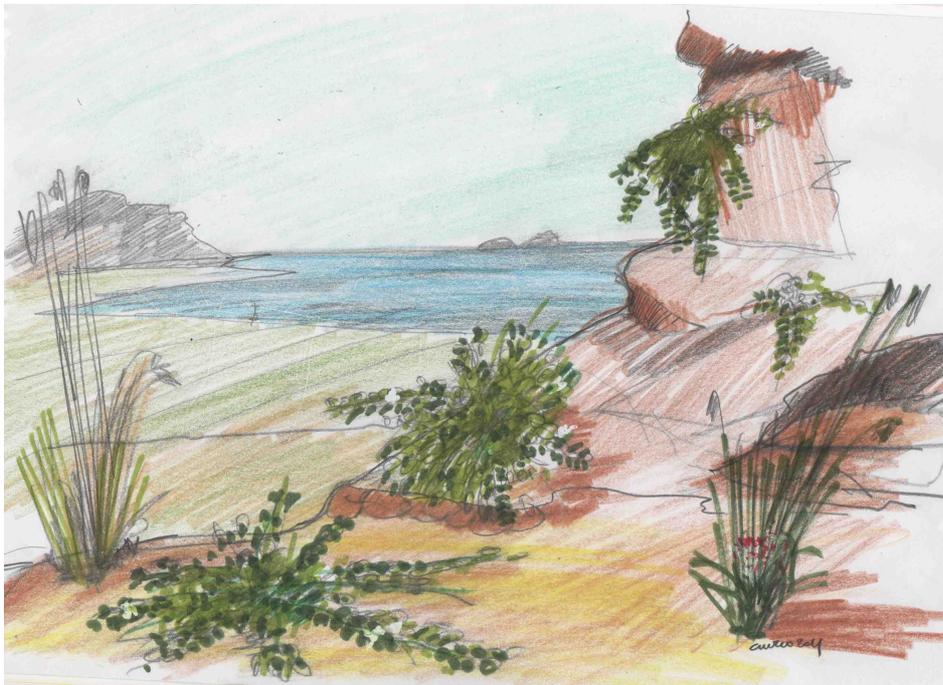


Fig. 9 Habitat di *C. spinosa* subsp. *rupestris*. (ill. Giorgio Gristina)

Da un punto di vista fitosociologico è specie dominante dell' associazione *Capparidetum rupestris* O. Bolòs e Molinier 1958, cenosi casmo-nitrofila (appartenente alla classe *Parietarietea judaicae* Oberd. 1977 ordine dei *Tortulo-Cymbalarietalia* Segal 1969 (=Parietarietalia *judaicae* Rivas-Martínez 1969 corr. Oberd. 1977) alleanza del *Parietarium judaicae* Segal 1969) piuttosto comune in Sicilia (GIANGUZZI *et al.*, 1993).

### 1.3 Fenologia, impollinazione e dispersione

Le due sottospecie in Sicilia si differenziano anche dal punto di vista fenologico. La subsp. *spinosa* mostra una precoce perdita delle foglie tra ottobre e novembre, periodo oltre il quale l'apparato epigeo della pianta va incontro a disseccamento. La subsp. *rupestris* invece può mantenere le foglie anche in periodo invernale, soprattutto negli individui che vivono in ambienti riparati come i versanti esposti a sud (FICI, 2001), o i monumenti e i vecchi muri all'interno delle città. Essa ha inoltre la capacità di germogliare non appena le temperature cominciano ad aumentare, perché mantiene gran parte delle ramificazioni ed il disseccamento interessa soltanto le estremità non lignificate.

La subsp. *spinosa* ha un ciclo più condensato che dura da maggio a settembre, mentre la subsp. *rupestris* ha un ciclo vegetativo più esteso che si protrae da marzo a ottobre (FICI, 2001). Questo influisce sulla produzione di bottoni fiorali che è più abbondante poiché estesa nel tempo nel taxon con periodo vegetativo più lungo.

Per quanto riguarda le entità siciliane non vi sono studi approfonditi riguardo l'impollinazione. Dalla letteratura è noto che la specie è allogama e a fioritura notturna, che avviene tra le 18:00 e le 10:00 del giorno successivo (PETANIDOU *et al.*, 1996). Una notevole quantità e diversità di insetti visita gli attraenti fiori della specie, ricchi di nettare e di polline, ma la maggior parte di questi mostra una bassa efficienza di impollinazione (EISIKOWITCH *et al.*, 1986). In Israele i principali impollinatori sono considerati le falene e le api (EISIKOWITCH *et al.*, 1986, DAFNI *et al.*, 1987) mentre in Grecia sono principalmente le api (PETANIDOU, 1991). In ambiente mediterraneo i fiori di *C. spinosa* rappresentano un'importante fonte di nettare per gli impollinatori nel periodo estivo e in ambiente desertico (EISIKOWITCH *et al.*, 1986).

La dispersione dei semi avviene per mezzo di tutti quegli animali che in periodo estivo consumano i frutti, attratti dalla loro succosa e vistosa polpa (Fig. 10), soprattutto nel caso della subsp. *spinosa*. Tra questi ricordiamo per la Sicilia lucertole (FICI & LO VALVO 2004) e formiche (Fig. 11) (LI VIGNI & MELATI, 1999), riportate come dispersori anche per la Spagna (HÓDAR *et al.*, 1996, LUNA LORENTE & PÉREZ VICENTE, 1985) assieme ad uccelli quali *Sylvia conspicillata*, *Oenanthe leucura* (HÓDAR, 1994), e *Chlamydotis undulata* (VAN HEEZIK & SEDDON, 1999) (Fig. 12), specie quest'ultima che presenta curiosamente un areale di distribuzione ampiamente sovrapponibile a quello di *C. spinosa* (Fig. 13)



Fig. 10 Frutto deiscende di *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* con semi ancora attaccati alla polpa.



Fig. 11 Formica che trasporta un seme di *C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens*.



Fig.12 *Chlamydotis undulata* (Jacquin, 1784).

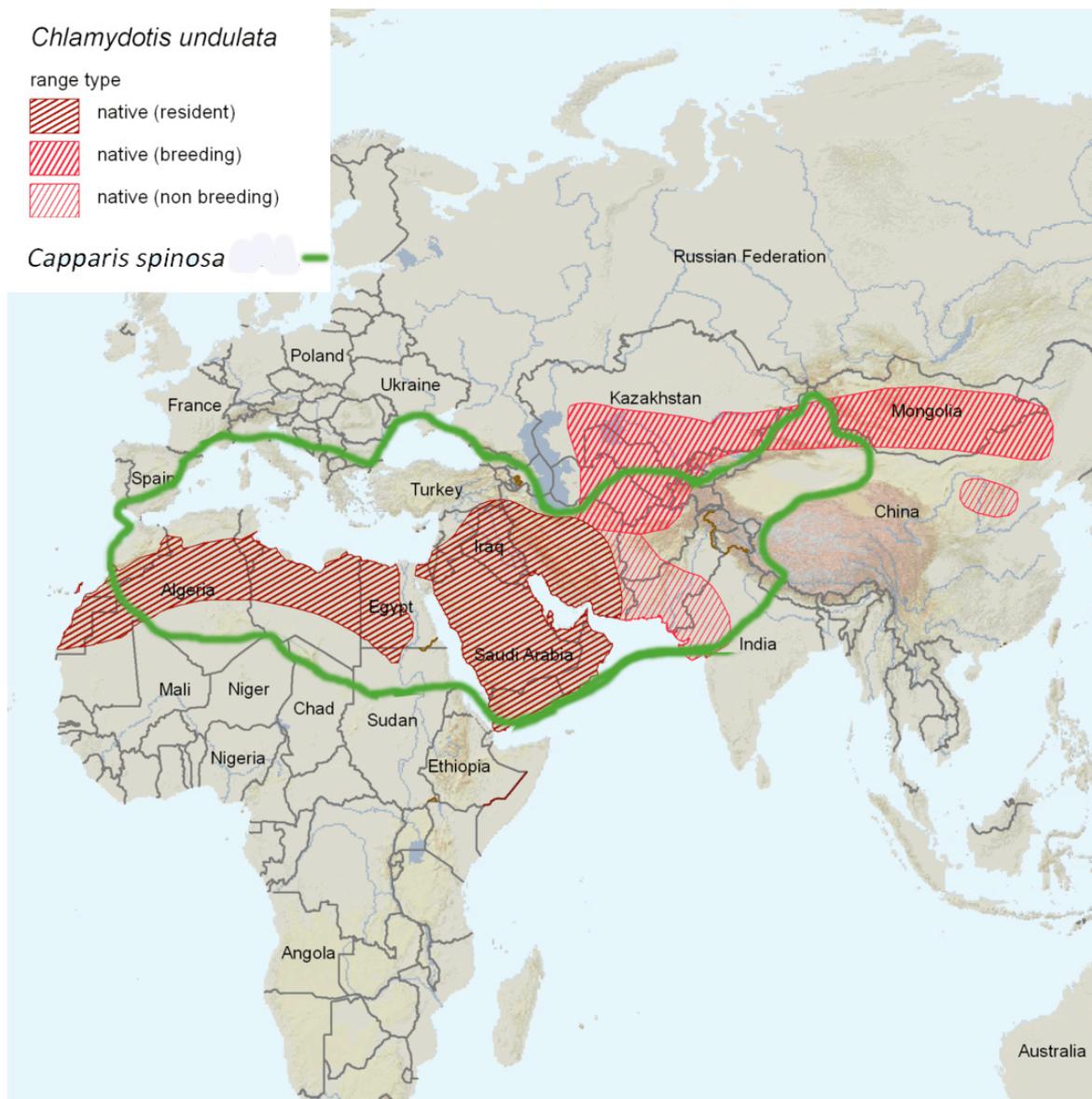


Fig. 13 Distribuzione di *Chlamydotis undulata* (Jacquin, 1784) (da BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2008) e del gruppo di *C. spinosa* in Eurasia e Nord Africa (modificata da JIANG *et al.*, 2007).

#### 1.4 Storia della Tassonomia del gruppo di *Capparis spinosa* L.

Il genere *Capparis* appartiene alla sottofamiglia Capperioideae che include anche i generi *Boscia*, *Cadaba*, *Crataeva*, *Morisonia*, ecc. distribuiti nel Nuovo e Vecchio Mondo. Al genere vengono attribuite a seconda dell'autore da 150 a più di 350 specie (SOZZI, 2001).

Il primo a fornire un approccio sistematico comprensivo al genere *Capparis* fu De Candolle nel 1824. Il suo schema tassonomico includeva nella sezione *Capparis* DC. (specie rappresentativa *C. spinosa* L.) tutte le specie del Vecchio Mondo, mentre le specie del Nuovo Mondo erano suddivise in 5 sezioni: *Capparidistrum* DC., *Cynophalla* DC., *Calanthea* DC., *Breniastrum* DC. e *Quadrella* DC.

BENTHAM & HOOKER (1862) aggiunsero successivamente tre nuove sezioni, *Sodada* (Forssk.) con la specie *C. decidua*, *Busbeckea* (Endl.) Benth. e Hook. con le specie australiane e *Beautempsia* (Gaud.) Benth. e Hook. con una specie americana. Successivamente Zohary (1960) con la revisione del genere nell'area mediterranea e nell'Asia occidentale, riconobbe l'esistenza di due gruppi biogeografici, quello tropicale comprendente *C. decidua*, *C. cartilaginea* e *C. mucronifolia* e quello Mediterraneo che include specie quali *C. spinosa*, *C. ovata* e *C. leucophylla* che hanno perso il legame con i gruppi ancestrali africani. Tutte le specie da lui considerate appartengono alla sezione *Capparis* sensu De Candolle (1824). All'interno delle tre specie mediterranee l'autore distinse numerose varietà (Tab. 1) ipotizzando, sulla base della presenza di piante con fenotipo intermedio nelle zone di contatto, fenomeni di ibridazione.

Tab. 1 I taxa del genere <i>Capparis</i> nei paesi mediterranei e del vicino oriente (ZOHARY, 1960)	
1. <i>C. spinosa</i> L.	2. <i>C. ovata</i> Desf.
var. subsp. <i>spinosa</i>	var. <i>ovata</i>
var. <i>inermis</i> Turra	var. <i>sicula</i> (Duham.) Zoh.
var. <i>parviflora</i> J.Gay	var. <i>herbacea</i> (Willd.) Zoh.
var. <i>aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	var. <i>palestina</i> Zoh.
var. <i>arvensis</i> Zoh.	var. <i>microphylla</i> (Ledeb.) Zoh.
var. <i>pubescens</i> Zoh.	var. <i>kurdica</i> Zoh.
var. <i>deserti</i> Zoh.	
3. <i>C. leucophylla</i> DC.	4. <i>C. mucronifolia</i> Boiss.
var. <i>leucophylla</i>	
var. <i>parviflora</i> (Boiss.) Zoh.	
5. <i>C. cartilaginea</i> Decne	6. <i>C. decidua</i> (Forssk.) Edgew.

JACOBS (1965) nella sua revisione del genere dall'Indo al Pacifico riconobbe 4 sezioni: Sect. *Capparis* monotipica con *C. spinosa*, Sect. *Sodada* monotipica con *C. decidua*, Sect. *Monostichocalyx* Radlk. con una nuova delimitazione comprendente la maggior parte delle specie precedentemente incluse nella sezione *Capparis* (= *Eucapparis* DC.) per un totale di 65 specie nell'area in revisione, Sect. *Busbeckea* con 14 specie. Tra le sue considerazioni vi è un'aspra critica al lavoro di ZOHARY (1960) che egli ritiene di scarsa utilità per la comprensione della variabilità del gruppo, in quanto particolarmente povero di informazioni sulla distribuzione dei taxa e nelle descrizioni e soprattutto di una chiave analitica per il riconoscimento delle forme descritte.

HIGTON & AKEROYD (1991) con il loro studio sulla variabilità di *C. spinosa* L. nella parte europea della regione mediterranea, hanno cercato più recentemente di mettere ordine nel gruppo attraverso un'analisi dei caratteri morfologici su campioni di erbario. Essi hanno semplificato il complicato schema di ZOHARY, raggruppando tre delle specie e sette delle varietà da lui indicate, in un'unica specie, *C. spinosa* L., suddivisa nella subsp. *spinosa* e nella subsp. *rupestris* (*C. spinosa* var. *inermis* Turra).

All'interno della subsp. *spinosa* essi riconoscono una var. *spinosa* alla quale attribuiscono le entità coltivate, ponendovi in sinonimia *C. leucophylla* DC., *C. parviflora* Boiss. e *C. deserti* (Zohary) Tackh. & Boulos; ed una var. *canescens* che ritengono possa essere

probabilmente la variante autoctona delle forme coltivate, alla quale riconducono i sinonimi *C. ovata* Desf., *C. herbacea* Willd. e *C. sicula* Duham..

Infine negli ultimi anni, un gruppo di botanici spagnoli, prima con uno studio genetico attraverso marcatori molecolari AFLP (INOCENCIO *et al.*, 2005) e poi con una revisione sistematica della sezione *Capparis* (INOCENCIO *et al.*, 2006) basata sui caratteri morfologici, applicando un concetto di specie molto ristretto (*splitter*), hanno rivoluzionato nuovamente lo schema tassonomico del gruppo riconoscendo 10 specie, e 12 sottospecie, di cui 4 nuove, riprendendo il lavoro di ZOHARY (1960). In particolare essi hanno elevato al rango specifico le sottospecie considerate da HIGTON & AKEROYD (1991), comprese le due varietà, e le hanno classificate con i seguenti nomi: *C. spinosa* (*C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *spinosa*), *C. sicula* (*C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens*) *C. orientalis* (*C. spinosa* subsp. *rupestris*). Sono state descritte due nuove specie per la regione mediterranea, *C. atlantica* Inocencio, Rivera, Obon & Alcaraz, distribuita nelle montagne calcaree dell'Atlante in Marocco spesso in prossimità di insediamenti umani e *C. zohary* Inocencio, Rivera, Obon & Alcaraz, anch'essa spesso ritrovata in prossimità di insediamenti umani in Algeria, Egitto, Grecia, Israele, Giordania, Libano, Marocco, Spagna, Siria e Turchia. Gli stessi autori mettono in risalto la confusione all'interno del gruppo che si riflette nei numerosi cambiamenti di rango e di nome subiti dai taxa, evidenziando soprattutto il fatto che *C. spinosa* sia stata utilizzata come *blanket* da numerosi botanici per coprire lo scarso livello di definizione dei taxa in *Capparis* sezione *Capparis*.

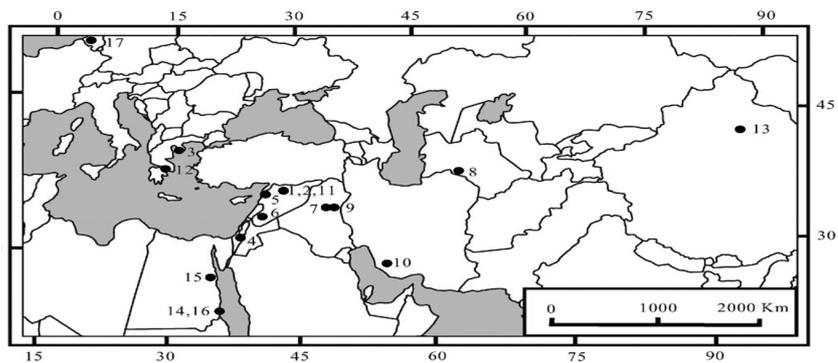
## 1.5 Archeobotanica

Il capperò è una pianta che ha una lunga storia di utilizzo da parte dell'uomo (SOZZI, 2001). Probabilmente già dall'epoca preistorica parti della pianta, principalmente i frutti, venivano utilizzati a scopo alimentare, come ci testimoniano i resti rinvenuti in Egitto in un sito Paleolitico risalente a 17-18.000 anni fa. Il fatto che il capperò sia stata un'essenza presente nella dieta dell'uomo o comunque utilizzata per altri scopi da molti millenni, è confermata da numerosi altri ritrovamenti di resti di frutti, provenienti da siti preistorici riportati alla luce in Iran ed in Iraq risalenti ad 8000 anni fa (RENFREW, 1973) o di semi risalenti al Mesolitico inferiore (9500 anni fa) (HANSEN, 1991) provenienti dalla Siria. Resti di altre parti di questo arbusto, come boccioli fiorali e carbone sono stati rinvenuti in numerosi altri siti archeologici di paesi della regione mediterranea e dell'Asia minore (Cipro, Egitto, Grecia, Israele, Spagna, Turchia, Iraq e Siria) (RIVERA *et al.*, 2002) e della Cina (Fig. 14) (JIANG *et al.*, 2007). L'attendibilità di questi ritrovamenti e quindi del dato archeologico sull'utilizzo del capperò da parte dell'uomo è buona. Infatti, sebbene per i ritrovamenti di semi, in alcuni casi, non si possa escludere completamente l'accidentalità della loro presenza nei siti archeologici vista l'ecologia della pianta, vi sono dei ritrovamenti che ci danno informazioni certe riguardo il suo utilizzo in quanto i resti sono stati rinvenuti all'interno di giare (JIANG *et al.*, 2007; VAN ZEIST & BAKKER – HEERES, 1985), il che dimostra con certezza la pratica degli uomini del passato di conservare i semi, i frutti ed i boccioli fiorali a scopo sia alimentare che medicinale (JIANG *et al.*, 2007). Questi importanti ritrovamenti provengono ancora dalla Siria e dalla Cina e risalgono ad un periodo compreso tra 2800 e 1400 anni fa. In Siria sono stati rinvenuti resti di frutti immaturi e boccioli fiorali all'interno di una giara che testimoniano sin dall'età del Bronzo l'uso alimentare (VAN ZEIST & BAKKER-HEERES, 1985) che doveva essere diffuso nell'area medio-orientale, dove ancora oggi la specie cresce abbondantemente. Il ritrovamento cinese, proveniente dalla provincia

dello Xinjiang, dove attualmente *C. spinosa* cresce in aree semidesertiche, probabilmente ci da informazioni più sull'uso terapeutico della pianta (JIANG *et al.*, 2007), in quanto i semi sono stati ritrovati in una piccola giara assieme a frutti foglie e rametti di *Cannabis sativa* L., pianta anch'essa utilizzata per i rituali e nella medicina orientale per le sue proprietà psicoattive e curative (JIANG *et al.*, 2006). E' interessante sottolineare che probabilmente i primi abitanti della regione furono di origine caucasioide e non asiatica, come testimoniato dai ritrovamenti archeologici di mummie dai lineamenti caucasici (MAIR, 1995). Inoltre il sito archeologico si trova sulla via della seta che attraversa proprio questi territori.

Oltre le testimonianze archeologiche sull'era preistorica, a partire dai Sumeri, ovvero da 2-3000 anni fa (SOZZI, 2001) abbiamo numerose testimonianze scritte dove viene nominato il capperò. Tra i tanti IPOCRATE (IV secolo A.C.) descrive le proprietà medicinali delle varie parti della pianta nei suoi trattati sulle malattie; TEOFRASTO (IV sec. A.C.) riporta nella sua opera "*De causis plantarum*" delle considerazioni sul gusto stimolante dei capperi e sul fatto che essi non crescano bene nei terreni coltivati, fatto che potrebbe fare pensare già a qualche forma diffusa di coltivazione di questa specie già in età ellenistica. PLINIO IL VECCHIO (*Historia naturalis*, I sec D.C.) invece sconsiglia di utilizzare i capperi provenienti da paesi stranieri, e descrive abbastanza dettagliatamente dove seminare i semi per coltivare la pianta ed evitare "*che essa invada tutto il terreno circostante*".

Dai ritrovamenti archeologici non è possibile desumere informazioni certe sul periodo ed il luogo d'origine della domesticazione e coltivazione del capperò. Unendo questi dati alle testimonianze scritte, si può tentare di risalire al periodo in cui la pianta cominciò ad essere utilizzata e si diffuse anche in coltura. La testimonianza di PLINIO fornisce un appoggio concreto all'ipotesi di una diffusione di questa pianta ad opera dell'uomo almeno a partire dall'epoca romana, e permette di ipotizzare una diffusione, anche accidentale, al di fuori del suo areale originario ad opera dei romani ed alla diffusione quindi di forme o varietà differenti nei territori dell'impero romano con conseguente rimescolamento genetico con le entità già presenti allo stato spontaneo. Questi dati ci spingono a domandarci se e quanto l'uomo possa avere contribuito a creare questa confusione in un gruppo per sua natura già complesso, come il genere *Capparis*, considerando il fatto che non sono da escludere ulteriori introduzioni volontarie o accidentali, ancora non documentate, sia in periodo pre-romano, ad esempio ad opera di Fenici, Greci e altri popoli mediterranei e del vicino oriente, sia anche successivamente con le colonizzazioni arabe.



(1) Tell Abu Hureyra; (2) Tell Mureybit; (3) Franchti Cave; (4) Nehal Hemar Cave; (5) Ras Shamra; (6) Tell Asward; (7) Tell es-Sawwan; (8) Jeitun; (9) Choga Mami; (10) Malyan; (11) Es-Sweyhat; (12) Corinth; (13) Yanghai Tombs; (14) Berenike; (15) Mons Claudian; (16) Shenshef; (17) Bruge.

Fig. 14 Mappa della distribuzione di alcuni tra i più importanti ritrovamenti archeobotanici di *C. spinosa* (da Jiang, 2007)

## 1.6 Etnobotanica

*C. spinosa* in passato, oltre ad essere apprezzato dai popoli antichi come condimento, era anche una importante fonte di medicinali. Data la sua vasta distribuzione vi è una grande varietà riguardo ai taxa intraspecifici (sottospecie, varietà) ed alle parti utilizzate nei diversi paesi. Infatti nell'area che va dalle coste atlantiche al Pacifico sono utilizzati i frutti, le radici, i boccioli fiorali, i giovani getti provenienti da 19 taxa, sui 23 totali (RIVERA *et al.*, 2003).

L'uso alimentare dei boccioli fiorali e dei frutti immaturi delle piante del gruppo di *C. spinosa*, principalmente conservati in salamoia o sott'aceto, è quello più diffuso fin dall'antichità nella maggior parte dei paesi. L'utilizzo dei frutti maturi con i semi sviluppati, ricchi di proteine, oli (acidi grassi insaturi) e fibre (AKGUL & OZCAN, 1999), sgraditi al gusto odierno per la durezza del tegumento dei semi, si pensa abbia avuto un ruolo rilevante in passato, all'inizio della domesticazione e della coltivazione (RIVERA *et al.*, 2002). Rimane traccia di questo utilizzo alimentare (umano e del bestiame) dei frutti (provenienti da specie maggiormente diffuse nei rispettivi paesi) nelle tradizioni di popoli dell'Armenia, Australia, Ciad, Dhofar, Egitto, India, Iran, Iraq, Pakistan, Somalia e Uzbekistan (RIVERA *et al.*, 2002). Altra parte utilizzata a scopo alimentare sono i teneri rametti giovani che vengono ancora utilizzati in alcune regioni mediterranee come verdura lessi o conservati sotto aceto.

Negli ultimi due secoli vi è stato un interesse sempre crescente per questo condimento, che ha portato alla diffusione di colture intensive nelle aree "tradizionali" per la produzione di capperi, quali le isole di Pantelleria e Salina, le Baleari e le regioni meridionali aride della Spagna. Più recentemente l'utilizzo in cucina si è diffuso anche in paesi del nuovo mondo, dell'Asia e dell'Australia, come testimoniano le crescenti esportazioni dei paesi produttori verso queste regioni. Questo marcato interesse si manifesta nella notevole quantità di studi e di programmi sperimentali sulla specie per sviluppare e diffondere la coltivazione in nuove aree geografiche. In particolare negli ultimi venti anni la Turchia ed il Marocco, la cui produzione si basa ancora maggiormente sulle piante spontanee, hanno avviato programmi di coltivazione intensiva così come l'Argentina dove questa coltura offre una buona alternativa per lo sfruttamento dei terreni marginali delle province aride alla base della cordigliera andina.

Gli usi medicinali del capperi sono numerosissimi e molti vengono ancora praticati in diversi paesi come Iran, Iraq, Libia ed India ecc. (RIVERA *et al.*, 2003). Fra i tanti si ricorda l'uso di decotti della radice della pianta come rimedio per i dolori reumatici o come analgesici in generale (contro il mal di denti, il mal di stomaco ecc.), ma anche come tonici, o l'uso delle foglie per curare le ulcerazioni della pelle o come afrodisiaco unitamente ai frutti o ai boccioli fiorali. Le proprietà medicinali sono state sfruttate nel mediterraneo sin dal 1 secolo D.C. (PLINIO, *Historia naturalis*). Le parti della pianta più utilizzate erano i semi, le radici e la corteccia, la cui pratica di utilizzo è documentata fino al medio-evo ed oltre.

Nell'ultimo ventennio l'interesse per i metaboliti secondari prodotti dalla pianta è cresciuto e sono stati realizzati numerosi studi che hanno rivelato la presenza d'importanti composti quali tocoferoli, polifenoli e alcaloidi. Questi nuovi composti isolati possono rivelarsi utili nella sintesi di farmaci per la cura di numerose malattie, infatti hanno mostrato importanti proprietà antiossidanti, immunostimolanti, antitumorali, anti diabetiche, antivirali, antibatteriche, antifungine, anti parassitarie, antisclerosi ecc. (TLILI *et al.*, 2010). Inoltre potrebbero servire per sperimentazioni nell'industria cosmetica, infatti in passato ad

esempio si utilizzava una crema a base di capperi per curare le rughe e dare un bel colorito alla pelle.

## 1.7 Tecniche di caratterizzazione genetica

Le tecniche che utilizzano i marcatori molecolari sono delle metodologie accurate e potenti sviluppate negli ultimi decenni che sono utilizzate nella ricerca in campo botanico per studi di varia natura ed hanno un notevole ambito applicativo. Sono molto utilizzate ad esempio in analisi e ricostruzioni filogenetiche, studi di diversità genetica, di ecologia molecolare, del sistema riproduttivo delle specie, e sono idonei per il *fingerprinting* varietale delle specie coltivate.

Le tipologie di marcatori si dividono in base alla loro natura genetica in mitocondriali, cloroplastici e nucleari; i primi due sono di derivazione uni-parentale, mentre gli ultimi sono ereditati da entrambi i parentali. In genere essi consentono di identificare con certezza delle specifiche sequenze nucleotidiche e quindi di analizzarne i polimorfismi in regioni omologhe di DNA. La scelta del tipo di marcatore dipende dal genoma che si vuole analizzare, dal tipo di studio e dal sistema riproduttivo della specie in analisi.

La maggior parte dei marcatori nucleari utilizzati negli studi di caratterizzazione molecolare e di *fingerprinting*, come ad esempio AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*), analizzano parti di genoma dei quali la funzione è per lo più sconosciuta, e permettono di indagare il grado di diversità o di similarità genetica di diversi individui nell'ambito di una o più popolazioni, o all'interno di una stessa specie o di specie diverse. Dei sopracitati marcatori, soltanto gli SSR sono codominanti e permettono di verificare la presenza di più alleli per un singolo locus, mentre tutti gli altri sono dominanti e multi - locus, pertanto non offrono la possibilità di distinguere i diversi alleli presenti per locus, ma danno esclusivamente un'informazione di presenza/assenza di un dato allele (Fig. 15).

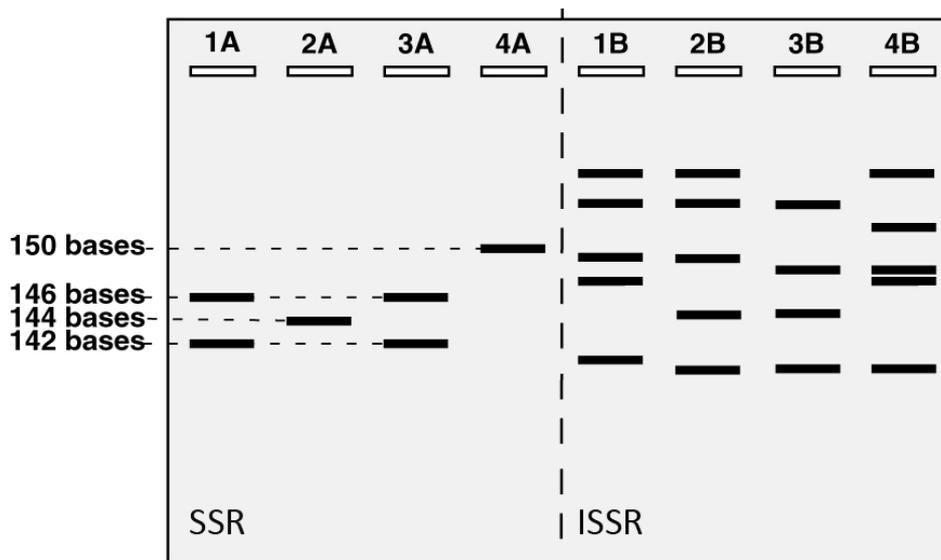


Fig. 15 Esempi di *pattern* elettroforetici di marcatori co-dominanti (SSR) e dominanti (ISSR, AFLP ecc.) (da FREELAND, 2005).

Queste tecniche sono basate sul modello teorico dell'orologio molecolare: assunta una velocità di mutazione costante, due sequenze di DNA (o due alleli), di due individui differenti, relative ad uno stesso locus, saranno tanto più diverse tra loro (in termini di numero di mutazioni accumulate) quanto maggiore è il tempo trascorso dalla loro separazione da una sequenza ancestrale appartenente a un loro progenitore comune. In sostanza, quanto maggiore è il numero di mutazioni accumulate da due individui in più loci tanto maggiore è la diversità genetica tra loro.

L'analisi con i marcatori molecolari ISSR si basa su una reazione di polimerizzazione a catena (PCR) e consiste nell'amplificazione di regioni genomiche comprese tra sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite, mediante l'uso di un primer costituito da una breve sequenza microsatellite (tipicamente 18-20 paia di basi) chiamata *core*, con 2-4 nucleotidi (*anchor*), casuali ed in genere degenerati, "ancorati" all'estremità 5' o a quella 3'. I primer ISSR si appaiano alle sequenze microsatelliti, abbondanti nel genoma eucariotico (TAUTZ & RENZ, 1984) ed estremamente variabili (LEVINSON & GUTMAN, 1987), ed amplificano tutte le sequenze comprese tra due SSRs invertite che posseggono alle estremità i nucleotidi complementari a quelli presenti nel *core* e che siano localizzate ad una distanza amplificabile dalla Taq polimerasi, generalmente compresa tra 150bp e 1500 bp. Sono dei marcatori dominanti, multi locus (portano fino a 25 prodotti di amplificazione in una reazione) come gli AFLP ed i RAPD, pertanto non permettono di identificare i diversi alleli presenti ad uno stesso locus. La scelta di questi marcatori per lo studio della diversità delle popolazioni siciliane di *C. spinosa* è stata motivata dal fatto che mostrano patterns altamente polimorfici (FANG & ROOSE, 1997) dovuti al frequente tasso di mutazione che caratterizza le sequenze microsatelliti e le regioni ad esse adiacenti, inficiando in maniera sostanziale l'appaiamento dei primer; sono già stati utilizzati per con buoni risultati per l'identificazione di cultivar di specie coltivate (FANG & ROOSE, 1997, SIRAGUSA *et al.*, 2008) e per lo studio della diversità genetica di popolazioni selvatiche e coltivate della stessa specie (NAN *et al.*, 2003); hanno una affidabilità e riproducibilità paragonabile agli SSR (BORNET & BRANCHARD, 2001), poiché le amplificazioni sono ottenute tramite primer specifici di lunghezza maggiore, che consentono l'uso di temperature di *annealing* più selettive, ad esempio rispetto ai RAPD (Nan *et al.*, 2003); non richiedono una conoscenza a priori delle sequenze di DNA per la costruzione dei primer (BORNET & BRANCHARD, 2001), il che rende i costi abbastanza contenuti, ed infine il quantitativo di DNA richiesto per la PCR è abbastanza basso.

## 1.8 Studi genetici su *Capparis spinosa* L.

Il cappero, *C. spinosa* L., possiede un numero cromosomico  $2n = 38$  (DARLINTONG & WYLIE, 1955).

Allo stato attuale esistono nella letteratura scientifica internazionale soltanto due studi genetici, a livello di popolazione (KHOUILDI *et al.*, 1999; INOCENCIO *et al.*, 2005) sulla specie oggetto di questa ricerca, ed uno che riguarda lo sviluppo di marcatori molecolari. Quest'ultimo ha riguardato lo sviluppo di microsatelliti cloroplastici (cpSSR) su *C. spinosa* (SIRAGUSA & CARIMI, 2009). Non è stato possibile sfruttare questi marcatori codominanti già disponibili perché il DNA cloroplastico è molto più conservativo di quello nucleare, infatti nelle piante superiori il suo tasso di mutazione viene stimato 4/5 volte più lento che nel genoma nucleare (WOLFE *et al.*, 1989). Essendo lo scopo di questo studio indagare la variabilità genetica all'interno di popolazioni di due sottospecie, in un'area relativamente

piccola, si è ritenuto più opportuno utilizzare dei marcatori nucleari, generalmente più variabili e polimorfici come gli ISSR e identificarne alcuni specifici per le entità oggetto di questa ricerca. Il secondo studio ha indagato sulla possibilità di utilizzare un altro tipo di marcatori molecolari, i RAPD, per la comparazione della variabilità genetica tra popolazioni di *C. spinosa* italiane e tunisine (KHOULDI *et al.*, 1999). L'uso di questi marcatori molecolari dominanti ha evidenziato una notevole quantità di polimorfismi genetici all'interno e fra le popolazioni. Ciononostante non hanno permesso di discriminare le popolazioni sulla base della loro provenienza geografica (KHOULDI *et al.*, 1999).

Il terzo ed ultimo studio ha analizzato le relazioni filogenetiche di diversi taxa del gruppo di *C. spinosa* provenienti da Spagna, Marocco e Siria attraverso la tecnica di *fingerprinting* degli AFLP (INOCENCIO *et al.*, 2005). Lo studio ha permesso di discriminare 4 su 5 dei taxa considerati. In particolare gli autori hanno evidenziato che la subsp. *rupestris* e la subsp. *spinosa* var. *canescens* sono ben differenziate geneticamente, rispettivamente con un buon numero di bande esclusive, mentre ipotizzano per la subsp. *spinosa*, che si trova in una situazione intermedia tra la due sottospecie, una origine ibrida a partire dai sopraccitati parentali.

## 2. Obiettivi della ricerca

La presente ricerca ha mirato a indagare la variabilità morfologica e genetica intra ed inter-popolazione di *C. spinosa* in Sicilia per quanto riguarda:

- le popolazioni della subsp. *spinosa*
- le popolazioni della subsp. *rupestris*
- le entità coltivate nelle isole circumsiciliane (Pantelleria e Salina)

Gli scopi principali dell'indagine sono stati di:

- ottenere dati sulla diversità delle popolazioni naturali ed in coltura, sulle loro relazioni evolutive e gli eventuali flussi genici
- chiarire lo stato tassonomico delle due entità in Sicilia e degli individui supposti ibridi che si rinvencono nelle zone di contatto tra le due sottospecie e sporadicamente anche in popolazioni isolate
- fornire dati sulla diversità genetica della specie in Sicilia per eventuali programmi di miglioramento genetico delle forme coltivate
- identificare dei marcatori specifici per le due sottospecie

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Nomenclatura adottata

La nomenclatura segue HIGTON & AKEROYD (1991), i quali riconoscono in Europa all'interno della specie *C. spinosa* due sottospecie, la subsp. *spinosa*, la quale a sua volta viene suddivisa in due varietà, nominale e var. *canescens* Cosson., e la subsp. *rupestris* (Sibth. e Sm.). Per gli *outgroup* di Cipro e della Cina si è tenuto conto della nomenclatura delle rispettive flore dei paesi (MEIKLE, 1977; MINGLI & TUCKER, 2008).

#### 3.2 Area di studio e selezione delle popolazioni

Le popolazioni campionate (Fig. 16) per le analisi morfologiche e genetiche, sono state scelte ed individuate su una vasta area del territorio siciliano. L'area di campionamento si estende dalla provincia di Palermo attraverso la serie "Gessoso-Solfifera" fino alle pendici dell'Etna ed all'altopiano Ibleo, comprese le tre isole circumsiciliane di Pantelleria, Salina e Lampedusa, in modo da includere nell'analisi una parte consistente della diversità genetica esistente in Sicilia nell'ambito di popolazioni naturali e coltivate.

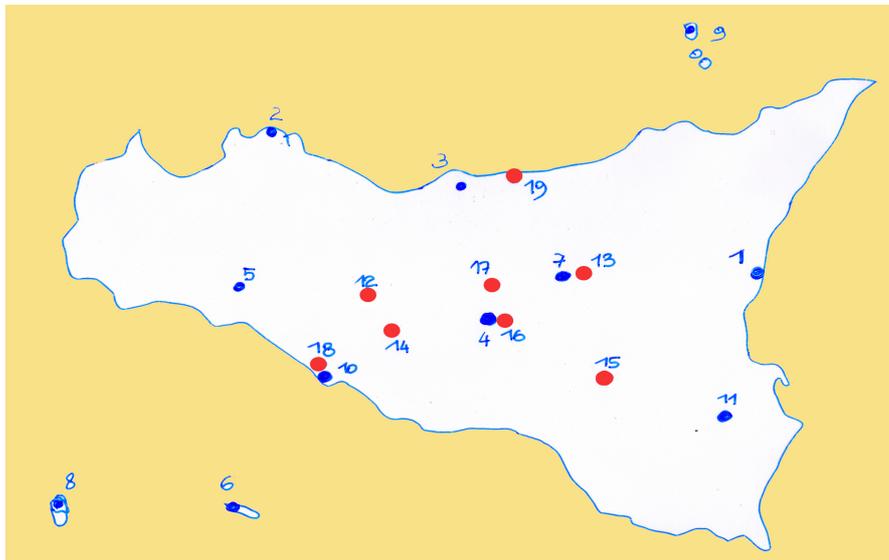


Fig. 16 Stazioni di campionamento. In tabella tra parentesi accanto al codice della popolazione è indicato il numero di individui campionati.

Legenda					
Popolazioni spontanee			Popolazioni coltivate		
subsp. <i>spinosa</i> (rosso)		subsp. <i>rupestris</i> (blu)	subsp. <i>rupestris</i> (blu)		
CC- CAM (11)	12	CR- ACI (10)	1	CR- PANc (10)	8
CC- LEO (10)	13	CR- BAR (16)	2	CR- SALc (9)	9
CC- MIL (10)	14	CR- CEF (10)	3		
CC- MIR (11)	15	CR- MOR (10)	4		
CC- MOR (10)	16	CR- LAR (12)	5		
CC- PCA (10)	17	CR- LAM (10)	6		
CC- SIC (12)	18	CR- LEO (10)	7		
CC- TOR (12)	19	CR- PAN (12)	8		
		CR- SAL (7)	9		
		CR- SIC (12)	10		
		CR- SOR (10)	11		

L'area di studio estendendosi su gran parte del territorio siculo, include tutti i substrati sui quali la specie è presente: vulcanici, calcarei, gessosi e argillosi. Abbiamo ritenuto opportuno includere nelle analisi popolazioni isolate delle due sottospecie per cercare di analizzare individui non influenzati da possibili fenomeni di ibridazione con l'altra sottospecie, e tentare di isolare così qualche marcatore specifico capace di distinguerle a livello molecolare. Le popolazioni che rispondono a questo criterio di scelta sono situate in aree geografiche quanto più distanti possibili da popolazioni dell'altra sottospecie e sono le seguenti: Cammarata, Caltagirone, Ponte Cinque Archi (Fig. 17) e Torremuzza per la subsp. *spinosa*, Acireale, Barcarello, Cefalù, Contrada Arancio e Sortino per la subsp. *rupestris*. Per le popolazioni di Barcarello e Torremuzza era già nota l'insolita presenza di sporadici individui intermedi (FICI, comunicazione personale) nonostante l'evidente isolamento geografico. La scelta di includere queste popolazioni e gli individui intermedi dall'analisi è stata fatta per approfondire la problematica riguardante l'ipotesi di ibridazione tra i due taxa. Nel corso dell'indagine è stato riscontrato lo stesso fenomeno nelle popolazioni di Contrada Arancio e Cammarata. Inoltre sono state inserite diverse popolazioni parapatriche, situate in aree dove le due sottospecie vivono a stretto contatto, all'interno delle quali sono stati identificati durante le indagini di campo individui con caratteri intermedi. In particolare si tratta delle popolazioni di Siculiana, Milena (Fig. 18), Fiume Morello (Fig. 19) e Leonforte, che si trovano in aree della serie gessoso solfifera dove le argille vengono a contatto con gli ambienti rupestri calcarei, calcarenitici e gessosi presenti nell'area.

Questi criteri di scelta delle popolazioni ci hanno permesso di fare ipotesi attraverso le analisi condotte sull' eventuale possibilità di flusso genico tra i due taxa, sulla sua entità e sulla natura degli individui intermedi.

Per quanto riguarda le popolazioni selvatiche delle isole circumsiciliane, queste sono da considerare popolazioni pure di subsp. *rupestris* in quanto nelle isole è assente l'habitat della subsp. *spinosa*. E' comunque da evidenziare che non si possono escludere fenomeni di importazione di piante o di semi da altre aree attribuiti all'azione dell'uomo.

Il materiale vegetale per le analisi è stato prelevato da 21 popolazioni siciliane di *C. spinosa* e da tre popolazioni *outgroup* i cui dettagli sono riportati in tabella 2 e 3. In totale sono stati analizzati 222 genotipi siciliani e 21 provenienti da altre aree, Roma (6), Cipro (5) e Cina (10). Gli *outgroup* sono stati utilizzati per verificare la validità dei marcatori utilizzati in ambito extra-siciliano.

La popolazione di Roma è stata scelta come popolazione pura della subsp. *rupestris*.

La popolazione di Cipro è stata scelta per la sua particolare posizione rispetto all'areale della specie, a metà tra oriente e occidente.

Quella della Cina è stata inclusa per verificare la presenza dei marcatori individuati anche in aree molto distanti dell'areale della specie.

Tabella 2 Popolazioni analizzate

Codice popolazione	Località	N° individui analizzati	N° fenotipi intermedi
<b>subsp. spinosa</b>			
CC_CAM	Cammarata (AG)	11	1
CC_LEO	Leonforte (EN)	10	4
CC_MIL	Milena (CL)	10	4
CC_MIR	Contrada Mirabella (CT)	11	1
CC_MOR	Fiume Morello (EN/CL)	10	5
CC_PCA	Ponte Cinque Archi (CL)	10	0
CC_SIC	Siculiana (AG)	12	10
CC_TOR	Torremuzza (ME)	12	1
	Totale	86	26
<b>subsp. rupestris</b>			
CR_ACI	Acireale (CT)	10	0
CR_BAR	Barcarello (PA)	16	6
CR_CEF	Cefalù (PA)	10	0
CR_LAM	Lampedusa (AG)	10	0
CR_LAR	Contrada Arancio (AG)	12	1
CR_LEO	Leonforte (EN)	10	0
CR_MOR	Fiume Morello (EN/CL)	10	0
CR_PAN	Pantelleria (TP)	12	0
CR_SAL	Salina (ME)	7	0
CR_SIC	Siculiana (AG)	10	0
CR_SOR	Sortino (SR)	10	0
	Totale	117	7
<b>subsp. rupestris (coltivate)</b>			
CR_PAN	Pantelleria (TP)	10	2
CR_SAL	Salina (ME)	9	9
	Totale	19	7
	<b>Totale</b>	<b>222</b>	<b>44</b>

Tabella 3 Siti di campionamento

Popolazione	Località	Descrizione del sito di campionamento:
<b>subsp. spinosa</b>		
CC_CAM	Cammarata (AG)	massicciata ferroviaria e bordo strada nei pressi del bivio Cammarata, SS121 Palermo - Agrigento.
CC_LEO	Leonforte (EN)	Bordi dei campi e bordi strada SS121 Enna - Leonforte; presenza di individui dai caratteri intermedi alla base delle rupi o sui muri di contenimento stradale.
CC_MIL	Milena (CL)	SP24 Campofranco – Caltanissetta nei pressi di Milena, alla base di uno sperone roccioso di natura gessosa su terreno argilloso misto a detriti; popolazione con diversi individui dalla morfologia intermedia.
CC_MIR	Contrada Mirabella (CT)	Bordi strada e bordi dei campi in contrada Mirabella nei pressi di Caltagirone su terreno argillo-mamoso. L'unico individuo dalle caratteristiche intermedie proviene da un muro di contenimento stradale della città abbastanza distante dal popolamento puro analizzato.
CC_MOR	Fiume Morello (EN/CL)	Nei pressi del ponte Capodarso all'interno della riserva naturale orientata di Monte Capodarso e Valle dell'Imera Meridionale, lungo il sentiero che costeggia il Fiume Morello; sono presenti diversi individui intermedi alla base delle rupi.
CC_PCA	Ponte Cinque Archi (CL)	Presso lo svincolo autostradale della A19 di Ponte Cinque Archi, su di un terreno pianeggiante argilloso coltivato a seminativo.
CC_SIC	Siculiana (AG)	Alla base di una parete rocciosa di natura gessosa, su terreno argilloso misto a detriti e su muro di contenimento stradale. Sono presenti numerosi individui intermedi.
CC_TOR	Torremuzza (ME)	Litorale presso Torremuzza, su terreno incolto pascolato e su muro stradale. Sul muretto a secco che delimita il campo è presente un individuo dalla morfologia intermedia.
<b>subsp. rupestris</b>		
CR_ACI	Acireale (CT)	Rocce vulcaniche, lungo il sentiero della riserva naturale della Timpa di Acireale e sui massi ciclopici della spiaggia sottostante.
CR_BAR	Barcarello (PA)	Costa rocciosa carbonatica all'interno della riserva di Capo Gallo, sono presenti tre individui dai caratteri intermedi. Comprende anche altri 3 individui intermedi ed uno puro, provenienti dall' area costiera del porticciolo turistico dell'Arenella di Palermo.
CR_CEF	Cefalù (PA)	Rupi prospicienti la strada per il porto di Presidiana e presso il faro.
CR_LAM	Lampedusa (AG)	Falesia rocciosa calcarea presso cala Creta.
CR_LAR	Contrada Arancio (AG)	Parete rocciosa calcarea presso le Case Gristina.
CR_LEO	Leonforte (EN)	Parete rocciosa carbonatica a monte della strada SS121 Enna- Leonforte all'entrata del paese.
CR_MOR	Fiume Morello (EN/CL)	Costone roccioso calcarenitico presso il ponte Capodarso sul fiume Morello, all' interno della riserva naturale orientata di Monte Capodarso e Valle dell'Imera Meridionale.
CR_PAN	Pantelleria (TP)	Lungo tutto il perimetro dell'isola, raccolti in ambiente rupestre o roccioso quanto più lontano possibile da zone di coltivazione. Le forme coltivate provengono da cappereti diversi.
CR_SAL	Salina (ME)	Lungo tutto il perimetro dell'isola in ambiente rupestre o roccioso quanto più lontano possibile da zone di coltivazione. Le forme coltivate provengono da cappereti diversi.
CR_SIC	Siculiana Marina (AG)	Parete rocciosa di natura gessosa e ambiente semi-rupestre sottostante.
CR_SOR	Sortino (SR)	Presso la Necropoli di Pantalica, lungo un costone roccioso calcarea interessato dalla presenza di tombe risalenti al XII sec a.c.
<b>"Outgroup"</b>		
ROMA	Roma	Sulle mura Aureliane del quartiere di San Lorenzo
CIPRO	Cipro	Scarpate detritiche in ambienti di gariga.
CINA	Cina	Regione arida e semi-desertica dello Xinjiang.



Fig. 17 Stazione della popolazione CC-PCA, Ponte Cinque Archi (CL).  
In primo piano piante con portamento tipico della subsp. *spinosa*



Fig. 18 Stazione della popolazione CC-MIL, Milena (CL), dopo un incendio estivo.



Fig. 19 Stazione della popolazione CR-MOR, Fiume Morello (EN/CL)

### 3.3 Metodi di campionamento: raccolta del materiale

Le attività di campionamento, preparazione e conservazione della maggior parte del materiale fogliare utilizzato sono state svolte a settembre 2008. La raccolta del materiale dalle popolazioni spontanee e coltivate nelle Isole di Pantelleria e Salina, è stata svolta nel periodo della raccolta dei boccioli fiorali, seguendo il protocollo adottato nella precedente stagione di campionamento, per scegliere accuratamente gli individui dei biotipi da analizzare.

Tutti gli individui scelti per lo studio sono stati cartellinati e ne è stata rilevata la posizione geografica tramite GPS di precisione fornito dall' Istituto di Genetica Vegetale del CNR di Palermo. Per alcune popolazioni dove per motivi logistici non è stato possibile rilevare la posizione delle piante tramite GPS, è stata realizzata una mappatura cartografica sul campo e successivamente gli individui sono stati cartografati in ambiente GIS con l'ausilio delle ortofoto delle stazioni.

Da ogni popolazione è stato collezionato materiale fogliare proveniente da una media di 10 individui (*Tab. 2*) scelti a caso, mentre il numero degli individui è maggiore per alcune popolazioni dove sono stati inclusi volontariamente individui dalle caratteristiche morfologiche intermedie fra i due taxa.

I campioni di foglie prelevati sono stati conservati in borse termiche durante i sopralluoghi per evitarne il deterioramento. Successivamente sono stati conservati in frigorifero a 4°C prima di essere preparati in laboratorio con due lavaggi, uno in acqua, per eliminare eventuali impurità presenti sulla superficie fogliare ed uno in acqua distillata deionizzata, per purificare ulteriormente il materiale. Per ogni individuo sono stati preparati due campioni, un campione già pesato da 0,3 g da utilizzare per l'estrazione del DNA ed uno con materiale sufficiente a svolgere ulteriori analisi, nel caso l'estrazione non fosse riuscita o fossero necessarie ulteriori indagini future. I campioni una volta puliti sono stati conservati a -80°C nel congelatore dell'Istituto di Genetica Vegetale del CNR di Palermo. Successivamente il materiale è stato preparato per l'estrazione del DNA, pestandolo in tubi da 2 ml con pestelli di plastica autoclavati in presenza di azoto liquido fino all'ottenimento di una polvere fine, e nuovamente conservato a -80°C.

Il materiale fogliare delle popolazioni extra-siciliane di Roma e Cipro è stato anch'esso raccolto direttamente in campo, seguendo la stessa metodologia utilizzata per il campionamento e la conservazione del materiale siciliano.

Il materiale fogliare della popolazione cinese è stato prelevato da plantule ottenute in vitro. I semi da cui sono state ricavate suddette plantule sono stati forniti da ricercatori locali e provengono da piante appartenenti alla subsp. *spinosa* della provincia dello Xinjiang. Poiché i semi sono stati raccolti da diversi individui, ogni plantula è stata considerata come un individuo a sé.

Nel mese di Settembre 2010, alla fine della stagione vegetativa della pianta, è stato effettuato il campionamento del materiale fogliare, da ciascun individuo cartellinato, per le analisi del morfotipo. Fanno eccezione le popolazioni di Salina e di Lampedusa, per cui non è stato possibile effettuare il campionamento, e alcuni individui (6) che non sono stati ritrovati in campo a causa della perdita del cartellino.

Il materiale fogliare è stato raccolto quindi da 191 piante ancora cartellinate, sulle 222 totali, prelevando 5 foglie da ogni individuo e conservandole in appositi sacchetti di plastica sigillati, per evitarne l'appassimento ed il deterioramento, e misurandoli in

laboratorio con l'ausilio di un calibro digitale, con una precisione al centesimo di millimetro. Altri caratteri quali il portamento e le ramificazioni sono stati valutati in campo.

### 3.4 Caratterizzazione morfologica

#### *Scelta e misurazione dei caratteri*

La caratterizzazione è stata realizzata con l'uso di caratteri morfologici qualitativi e quantitativi. Durante il campionamento, per ciascun individuo cartellinato, oltre alla registrazione delle coordinate GPS, e al tipo di habitat, primario (rupi, argille) e secondario (ambiente semi-rupestre, muretti a secco, vecchi muri bordi strada, massicciate ferroviarie ecc.), sono state annotate numerose informazioni qualitative:

- architettura della pianta (habitus ramificato/ non ramificato, portamento eretto, prostrato, pendulo) la presenza/assenza di stipole
- consistenza delle stipole (spinose persistenti/ setacee caduche)
- consistenza delle foglie
- consistenza del picciolo e presenza/assenza del solco centrale

I dati quantitativi riguardano esclusivamente il morfotipo fogliare e la lunghezza delle stipole. Sono stati presi in considerazione i caratteri morfologici indicati da HIGTON & AKEROYD (1991) nella loro revisione della variabilità di *C. spinosa* in Europa.

In particolare i parametri misurati sono stati i seguenti (Fig. 20):

- lunghezza della foglia in mm (L),
- lunghezza del picciolo in mm (P),
- larghezza della foglia in mm ad  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{3}{4}$  della lamina (W1, W2, W3)
- della lunghezza delle stipole (Ls) in mm

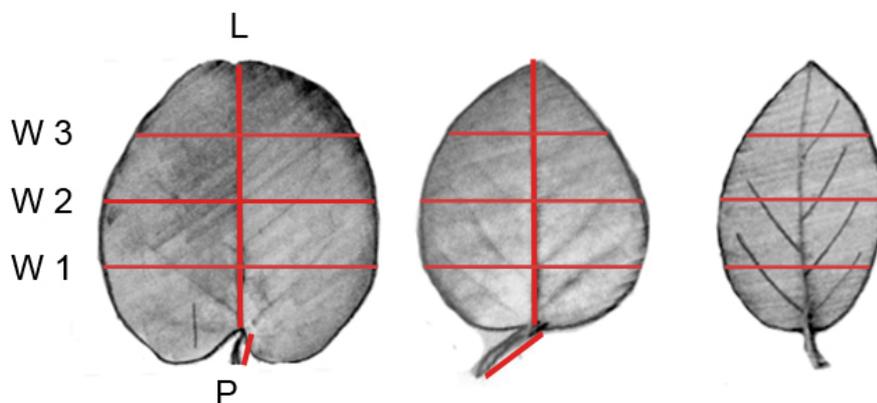


Fig. 20 Parametri utilizzati secondo HIGTON & AKERYOD (1991)

Dall'analisi della letteratura e delle flore dei paesi in cui la specie è presente, questi caratteri sono risultati i più idonei per il nostro scopo, per la facilità d'identificazione e misurazione, anche sui campioni di erbario, e meno soggetti all'interpretazione del florista di altri caratteri, fortemente dipendenti dallo stadio vegetativo in cui si osserva il campione in natura (o è stato raccolto il campione d'erbario), come la pelosità e la consistenza delle stipole. Non è stata presa in considerazione la morfologia florale poiché viene considerata troppo variabile e non utile alla classificazione dei campioni di erbario.

## *Analisi dei dati*

I parametri morfologici quantitativi misurati sono stati inseriti in una matrice e rielaborati prima dell'analisi. E' stata calcolata la media di ogni parametro per ogni individuo, a partire dai 5 valori misurati. Quindi i dati per popolazione, sono stati visualizzati graficamente tramite *boxplot (box and whiskers plot)*. I rettangoli (*box*) rappresentano il 50% dei dati, che sono quelli meno influenzati dai valori estremi (*outliers*); la barra al centro del box rappresenta la mediana, il punto giallo la media della popolazione. I segmenti che fuoriescono dai *box* indicano i valori massimi e minimi. Gli *outliers* non sono mostrati.

Inoltre sono stati calcolati gli indici di morfologia fogliare secondo HIGTON & AKEROYD (1991):  $x = W1-W3 / W2 * 100$ ,  $y = LF / LP$ , che unitamente alla misura della lunghezza delle stipole (Ls), sono stati usati per l'analisi multivariata attraverso la PCA con il software Pc-Ord (MC CUNE & MEFFORD, 2006).

Infine si sono effettuate delle analisi per verificare eventuali correlazioni tra i parametri quantitativi ed i parametri qualitativi, sovrapponendo alla PCA con i dati quantitativi la matrice con i parametri qualitativi.

Gli individui di Salina, Lampedusa e quelli il cui cartellino è andato perso non sono stati considerati nelle analisi del morfotipo fogliare.

### **3.5 Caratterizzazione molecolare PCR-ISSR**

#### *Estrazione del DNA genomico*

Il DNA genomico necessario per le amplificazioni mediante ISSR-PCR è stato ricavato dal materiale fogliare, opportunamente preparato, secondo il protocollo di estrazione CTAB modificato da DOYLE & DOYLE (1987) di seguito riportato:

- Trattamento del campione con 0,75 ml di EB preriscaldato e  $\beta$ -mercapto-etanolo a concentrazione finale 0,2 %
- Incubazione per 40 min. nel bagnetto a 60°C in agitazione continua
- Trattamento con 0,75 ml di cloroformio: isoamilalcol (24:1) per precipitare le proteine
- Centrifugazione a 1300 x g a 4°C per 15 min. per separare le due fasi
- Trasferimento del surnatante in un nuovo da 1,5 ml
- Mescolamento con 0,7 volumi di isopropanolo freddo ed incubazione a -20°C per almeno 1h per precipitare il DNA
- Centrifugazione per 15 min. a 4000 x g a 4°C
- Eliminazione del surnatante e lavaggio del pellet con 500  $\mu$ l di etanolo al 70%
- Centrifugazione per 5 min. in microfuge a 13000 rpm
- Eliminazione accurata del surnatante e asciugatura del pellet
- Risospensione o/n a 4°C in 500  $\mu$ l di acqua distillata deionizzata e autoclavata e
- Conservazione a -20°C

\* L' EB (extraction Buffer) è costituito da CTAB al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8 100 mM.

Inoltre, prima di analizzare campioni provenienti da aree extra siciliane, è stata verificata la possibilità di estrarre il DNA con il medesimo protocollo, a partire da materiale fogliare raccolto in natura ed essiccato, previa protezione con busta di carta, in silica gel

(CHASE & HILLS, 1991). I risultati, utilizzando come controlli il DNA degli stessi individui estratto da materiale fresco, hanno dato esito positivo.

Il DNA genomico estratto è stato poi quantizzato mediante corsa su gel elettroforetico in presenza di DNA di fago lambda a concentrazione nota (30 ng/μl), ed in seguito opportunamente diluito per ottenere la concentrazione adeguata di 5 ng/μl per procedere all'amplificazione mediante PCR.

### PCR-ISSR

Tutte le analisi per la caratterizzazione molecolare sono state realizzate presso il Laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto di Genetica Vegetale del CNR di Palermo. I primer sono stati selezionati attraverso uno screening su 30 differenti primer. La qualità degli amplificati è stata comparata su gel di agarosio, in presenza di etidio bromuro e sono stati selezionati i 6 primers (Tab. 4) con i patterns migliori: alcuni presi dalla bibliografia (FANG & ROOSE, 1997). Ogni amplificazione è stata eseguita in un volume di reazione di 25 μl contenente Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; primer 0,5 μM; dNTP 200 μM, 1 U di Taq polimerasi e 5 ng di DNA genomico. Le reazioni di polimerizzazione sono state eseguite in un termociclatore 96-well GeneAmp® PCR System 9700 (*Applied Biosystem – Foster City, Calif.*) utilizzando il seguente ciclo di amplificazione: 94 °C per 4 minuti (denaturazione iniziale); 36 cicli a 94 °C per 30 secondi (denaturazione), 50-58 °C (a seconda del primer vedi Tab. 3) per 45 secondi (ibridazione), 72 °C per 2 minuti (estensione) e 72 °C per 7 minuti (estensione finale). Il prodotto di reazione (con l'adeguato ammontare di loading buffer, blu di bromofenolo), è stato caricato su gel di agarosio 1,5% in TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) cui è stato aggiunto etidio bromuro 0,5 μg/ml. La corsa elettroforetica è stata eseguita per 7 ore a 100 V. I pattern elettroforetici sono stati visualizzati in un transilluminatore a raggi UV e fotografati con una macchina fotografica Kodak.

Tabella 4 – Primers ISSR		
Primer	sequenza	T (°C) "annealing"
CSR1	CCA(TGA) <sub>5</sub> TG	54
CSR2	(ACC) <sub>6</sub> CC	54
CSR3	GCA(AC) <sub>7</sub>	58
CSR4	AG(CA) <sub>8</sub>	58
CSR5	(AG) <sub>8</sub> YT,	50
CSR6	(AC) <sub>8</sub> YT	50

### Analisi dei dati

I profili elettroforetici dei campioni sono stati analizzati mediante il software di elaborazione d'immagini ImageJ, che consente un'analisi visuale precisa e standardizzabile. Dall'analisi visiva dei profili è stata costruita una matrice binaria con i dati di presenza/assenza relativa alle bande più evidenti scelte per l'analisi. Si è proceduto quindi all'analisi dei dati tramite il software GenAIEx (PEAKALL & SMOUSE, 2006) ed il software PopGene32.

In GenAEx sono state calcolate: la percentuale di loci polimorfici per ciascuna popolazione, la media totale e le medie delle due sottospecie, le distanze genetiche tra le popolazioni attraverso l'indice di Nei (NEI, 1972 1978), le distanze genetiche (distanza euclidea lineare) tra gli individui, ed i risultati sono stati visualizzati graficamente attraverso l'analisi multivariata delle coordinate principali (PCoA). Inoltre è stato calcolato l'indice di diversità genetica di Shannon (I) (Shannon 1948), che fornisce una stima della variabilità genetica presente nella popolazione complessiva e nelle sottopopolazioni. Il calcolo è basato sulle frequenze di determinati fenotipi molecolari (modelli di bande). L'indice assume un valore = 0 in assenza di differenze tra le frequenze dei fenotipi molecolari, ed un valore tanto maggiore quanto più elevata è tale differenza (BARCACCIA & FALCINELLI, 2006). Inoltre è stata fatta l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) complessiva e delle due sottospecie.

Con PopGene32 è stato calcolato il flusso genico ( $N_m$ ) complessivo tra le popolazioni e all'interno delle due sottospecie ed è stato costruito il dendrogramma, basato sulle distanze genetiche di Nei (1978) secondo il metodo UPGMA.

In tutti i calcoli eseguiti, le popolazioni selvatiche di Pantelleria e Salina sono state trattate separatamente dalle rispettive popolazioni coltivate per non inficiare i risultati. Gli *outgroup* non sono stati inseriti nelle analisi per il calcolo degli indici di diversità delle popolazioni siciliane. Sono stati utilizzati invece nella costruzione dell'albero filogenetico e nella PCoA per verificare le loro relazioni con le popolazioni siciliane.

## 4. Risultati

### CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA

#### 4.1 Portamento

Le popolazioni della subsp. *spinosa* hanno un apparato epigeo molto ramificato e scarsamente lignificato, che viene ricostruito ad ogni stagione vegetativa dal corno ipogeo della pianta e che alla fine della stagione va incontro a disseccamento completo. Le piante hanno un portamento procombente/ prostrato e crescono principalmente su suoli argillosi in aree coltivate, pascolate e soggette ad incendi (vedi Fig. 17 e 18 pag. 23); in assenza di questi fattori ecologici di disturbo, alcune di esse, ad esempio gli individui più annosi della popolazione di Milena, mostrano la tendenza ad assumere un portamento arbustivo. Infatti l'apparato vegetativo della passata stagione ormai secco, funge da supporto per il nuovo, che può così svilupparsi in altezza conferendo alle piante un aspetto più arbustivo.

Le popolazioni della subsp. *rupestris* vivendo per la maggior parte in ambiente rupestre hanno un portamento principalmente pendulo (Fig. 21), con scarsa ramificazione. Formano degli apparati vegetativi abbastanza sviluppati, con ramificazioni lignificate che possono raggiungere lunghezze notevoli. Alcune popolazioni costiere quali Barcarello e Acireale, o di ambienti semirupestri come quella di Contrada Arancio, sono costituite da piante che crescono al suolo (sempre su roccia nuda o su litosuoli) e presentano un portamento procombente (Fig. 22).



Fig. 21 Pianta della popolazione CR-SIC con portamento pendulo.



Fig. 22 Piante della popolazione CR-LAR con portamento procombente.

Anche qui in assenza di pascolo e di incendi, che eliminino l'impalcatura legnosa della pianta, l'apparato vegetativo si sviluppa notevolmente, conferendo alle piante più annose un portamento suffruticoso talvolta arbustivo.

Le piante coltivate, sviluppandosi su suolo o sui muretti a secco al bordo dei campi, hanno tutte un portamento procombente. Le potature annuali, che eliminano completamente tutti i rami vecchi lasciando solo una gemma alla base, fanno sì che la densità delle ramificazioni sia inferiore negli individui coltivati rispetto agli esemplari selvatici e le mantengono più prostrate. A Salina, nei pressi di una coltivazione abbandonata e presso una vecchia casa, sono stati rinvenuti alcuni esemplari che non essendo più potati, grazie alle favorevoli condizioni climatiche dell'isola, hanno assunto portamento eretto raggiungendo un'altezza prossima ai 2 m. Le coltivate di Salina hanno generalmente un portamento più eretto rispetto a quelle di Pantelleria e sono più vigorose.

Per quanto riguarda i fenotipi intermedi, si possono distinguere in due tipologie: quelli che si rinvergono nelle zone di contatto tra le due sottospecie, e quelli che si trovano invece in popolazioni isolate sia della subsp. *rupestris* come a Barcarello e Contrada Arancio, sia della subsp. *spinosa* come a Torremuzza.

I fenotipi intermedi delle zone di contatto, si rinvergono quasi sempre in habitat secondari come muri di contenimento stradale (Fig. 23, 24), bordi strada, ambienti semirupestri alla base delle rupi, ma sempre a livello del suolo e soltanto in un caso, nella popolazione di Fiume Morello, è stato trovato un esemplare su rupe. La maggior parte di essi possiede un fenotipo con apparati epigei molto ramificati, e soltanto due individui della popolazione di Fiume Morello non presentano questa caratteristica. Le piante che si sviluppano a terra, in ambiente semirupestre e a bordo strada, hanno un portamento procombente come alcuni esemplari di Siculiana e Fiume Morello (due individui di Milena mostrano un portamento più eretto), mentre quelle che crescono sui muri hanno portamento pendulo, come altre piante di Siculiana e di Leonforte.



Fig. 23 Individui con fenotipo intermedio, della popolazione CC-LEO, su un muro di contenimento della ferrovia

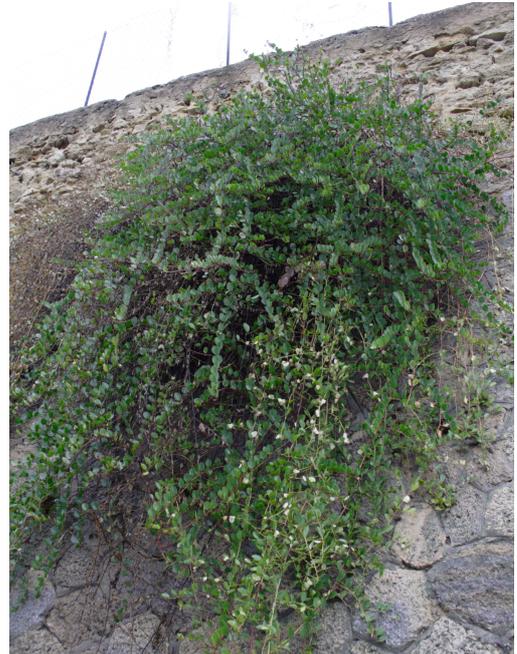


Fig. 24 Particolare di un individuo dal fenotipo intermedio su un muro lungo la circonvallazione di Caltagirone (CC-MIR).

Gli individui che si rinvergono nella popolazione isolata di Barcarello e Contrada Arancio, crescono a livello del suolo, in ambiente roccioso, presentano un apparato epigeo molto ramificati e portamento procombente (Fig. 25). L'unico individuo intermedio della

popolazione di Torremuzza si rinviene alla base di un muretto a secco, ha un apparato epigeo molto ramificato ed un portamento procombente.



Fig. 25 Particolare delle ramificazioni di un individuo dal fenotipo intermedio di Barcarello (CR-BAR) che cresce alla base di un muro.

I due individui coltivati di “Spinoso di Pantelleria”, hanno portamento procombente, possiedono un apparato epigeo non ramificato, e si sviluppano rispettivamente, uno su un muretto a secco (Fig. 26) di pietra lavica e l’altro in un cappereto.

Tutti e nove gli individui coltivati di Salina presentano un fenotipo intermedio con differenze tra le piante di “Spinosa di Salina” (Fig. 27) e di “Nocella” abbastanza evidenti. Le prime hanno un portamento procombente/eretto, crescono a livello del suolo, hanno numerose ramificazioni. Le seconde hanno portamento simile, crescono a livello del suolo, ma non presentano ramificazioni.

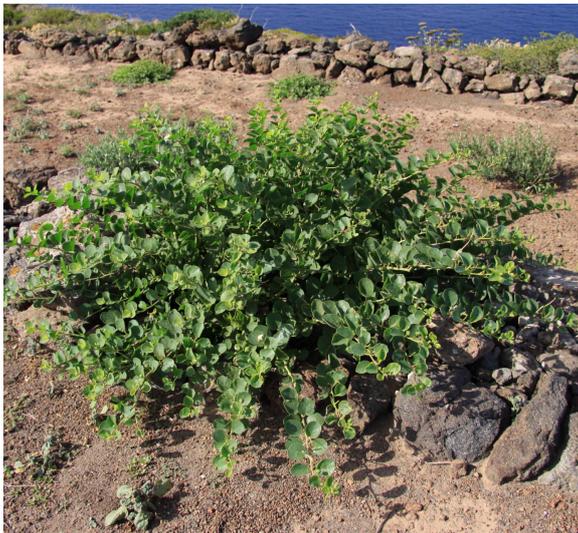


Fig. 26 Pianta di “Spinoso di Pantelleria” su un muretto a secco.



Fig. 27 Pianta di “Spinoso di Salina”

## 4.2 Morfologia fogliare

I parametri del morfotipo fogliare sono sensibilmente differenti tra le due sottospecie, e mostrano una certa variabilità intra-popolazione e tra popolazioni della stessa sottospecie. Le popolazioni della subsp. *rupestris* hanno valori nettamente superiori rispetto a quelle della subsp. *spinosa* per quanto riguarda la larghezza della foglia ad  $\frac{1}{4}$  (W1),  $\frac{1}{2}$  (W2) e  $\frac{3}{4}$  (W3), con notevoli differenze evidenziate sia dalle medie (Tab. 5) che dalle mediane (Fig. 29. 1, 2, 3). La larghezza maggiore soprattutto alla base (W1) ed all'apice (W3) della foglia, nella subsp. *rupestris*, riflette la sua morfologia ovato - orbicolare, cordata, mentre i suoi valori più bassi nella subsp. *spinosa* riflettono la sua forma ellittica, troncata alla base (Fig. 28).

Tabella 5 Medie dei parametri					
	W1 (mm)	W2 (mm)	W3 (mm)	LF (mm)	LP (mm)
<i>subsp. spinosa</i>					
media	22,11	25,43	17,98	36,37	6,86
dev. St.	2,94	3,20	2,42	4,38	0,92
<i>subsp. rupestris</i>					
media	36,23	39,04	29,00	40,68	9,46
dev. St.	6,81	6,91	5,58	6,94	1,79
Totale					
media	31,30	34,29	25,09	39,63	8,71
dev. St.	8,65	8,60	6,89	7,00	2,14

Per quanto riguarda la variabilità intra-popolazione della subsp. *spinosa* si nota una certa uniformità dei caratteri nelle popolazioni di Contrada Mirabella (2) e Ponte Cinque Archi (4). Le popolazioni di Cammarata (1), Milena (3), Fiume Morello (5), Siculiana (7) e Torremuzza (8), mostrano invece una maggiore variabilità e dei valori medi più alti. Le popolazioni della subsp. *rupestris* mostrano un'ampia variabilità per tutti e tre i parametri, ad eccezione della popolazione di Leonforte (14).

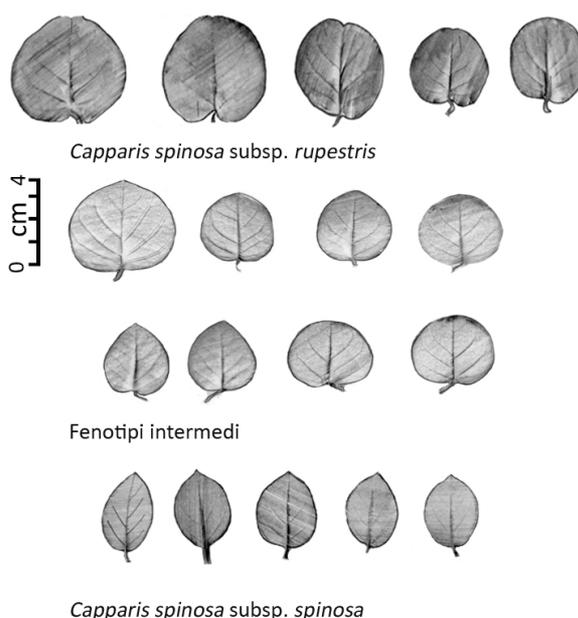


Fig. 28 Calco a matita delle lamine fogliari tipiche delle due sottospecie e dei fenotipi intermedi.

pop	N°
<i>subsp. spinosa</i>	
CC_CAM	1
CC_LEO	2
CC_MIL	3
CC_MIR	4
CC_MOR	5
CC_PCA	6
CC_SIC	7
CC_TOR	8
<i>subsp. rupestris</i>	
CR_ACI	9
CR_BAR	10
CR_CEF	11
CR_LAM	12
CR_LAR	13
CR_LEO	14
CR_MOR	15
CR_PAN	16
CR_SIC	17
CR_SOR	18

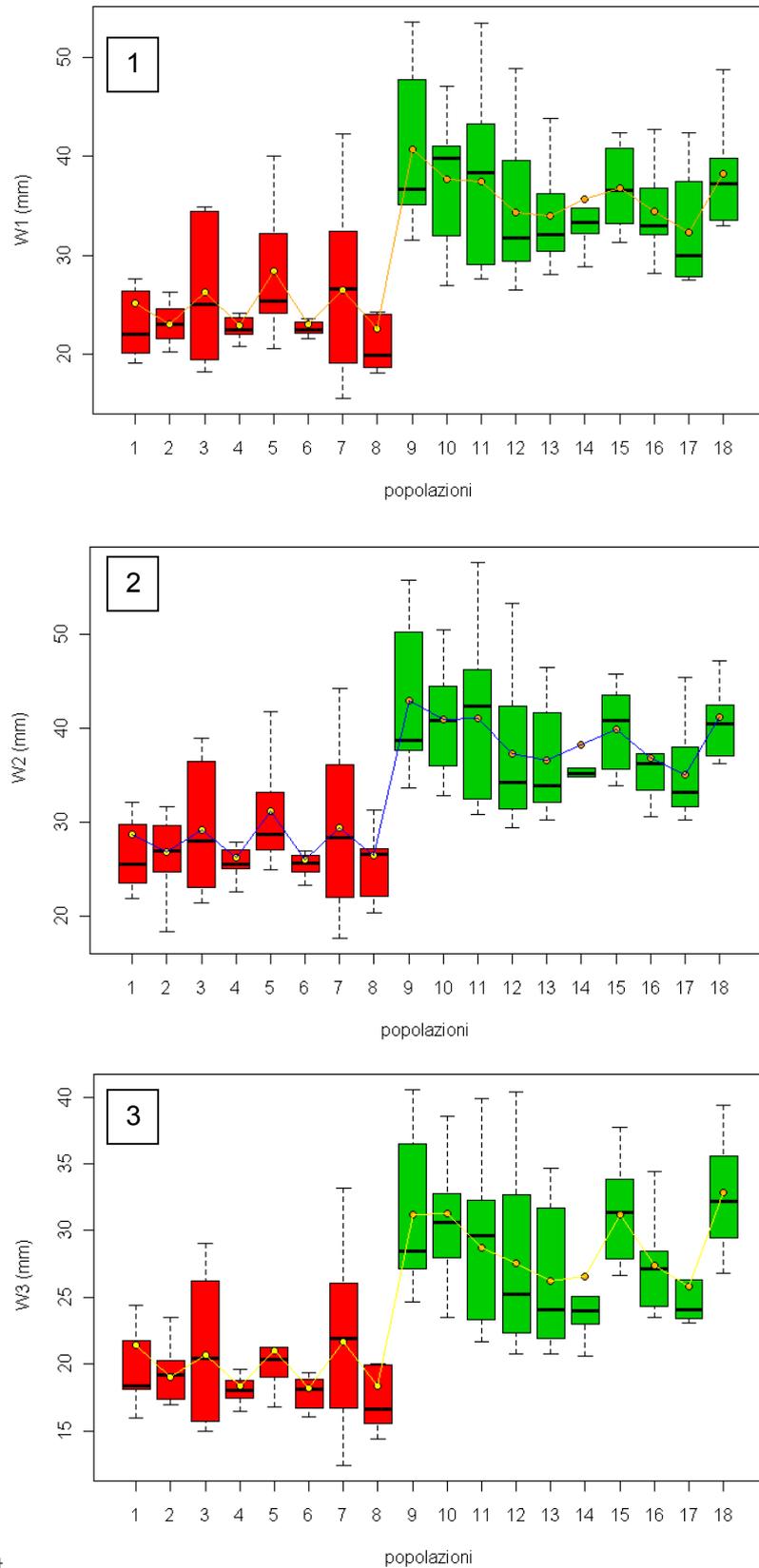


Fig. 29 (1, 2, 3) Boxplot (vedi paragrafo. 3.4 pag. 26) della larghezza della foglia (W1, W2, W3) nelle popolazioni (in nero la mediana, in giallo la media, in rosso le popolazioni della *subsp. spinosa*, in verde quelle della *subsp. rupestris*)

Per quanto riguarda la lunghezza della foglia le differenze sono poco distintive, invece la consistenza è un carattere importante che permette di distinguere le due sottospecie. Gli individui della subsp. *spinosa* presentano foglie di consistenza erbacea. Gli individui della subsp. *rupestris* hanno invece foglie cuoiose, carnose, in misura maggiore nelle popolazioni costiere prospicienti il mare. Gli individui intermedi presentano entrambe le tipologie, con una prevalenza per la tipologia carnosa, cuoiosa.

La lunghezza del picciolo mostra un'ampia variabilità (Fig. 30). Come per i parametri W1, W2, e W3, le lunghezze medie di alcune popolazioni della subsp. *spinosa* sono molto simili a quelle della subsp. *rupestris*. Si tratta delle popolazioni di Milena (3), Fiume Morello (5), Siculiana (7), dove la presenza dei fenotipi intermedi provoca un sensibile aumento della media. Dal grafico si può notare, un certo trend di aumento di lunghezza del picciolo dalla subsp. *spinosa* alla subsp. *rupestris*. La lunghezza del picciolo unitamente alla presenza di un caratteristico solco centrale è un buon carattere per discriminare i due taxa. Infatti questo risulta sensibilmente più corto ed esile nella subsp. *spinosa* con un evidente solco centrale, mentre è più sviluppato, privo di solco e contorto a maturità nella subsp. *rupestris*. Inoltre la maggior parte degli individui intermedi presenta questa caratteristica distintiva ad eccezione di alcuni individui.

pop	N°
<b>subsp. <i>spinosa</i></b>	
CC_CAM	1
CC_LEO	2
CC_MIL	3
CC_MIR	4
CC_MOR	5
CC_PCA	6
CC_SIC	7
CC_TOR	8
<b>subsp. <i>rupestris</i></b>	
CR_ACI	9
CR_BAR	10
CR_CEF	11
CR_LAM	12
CR_LAR	13
CR_LEO	14
CR_MOR	15
CR_PAN	16
CR_SIC	17
CR_SOR	18

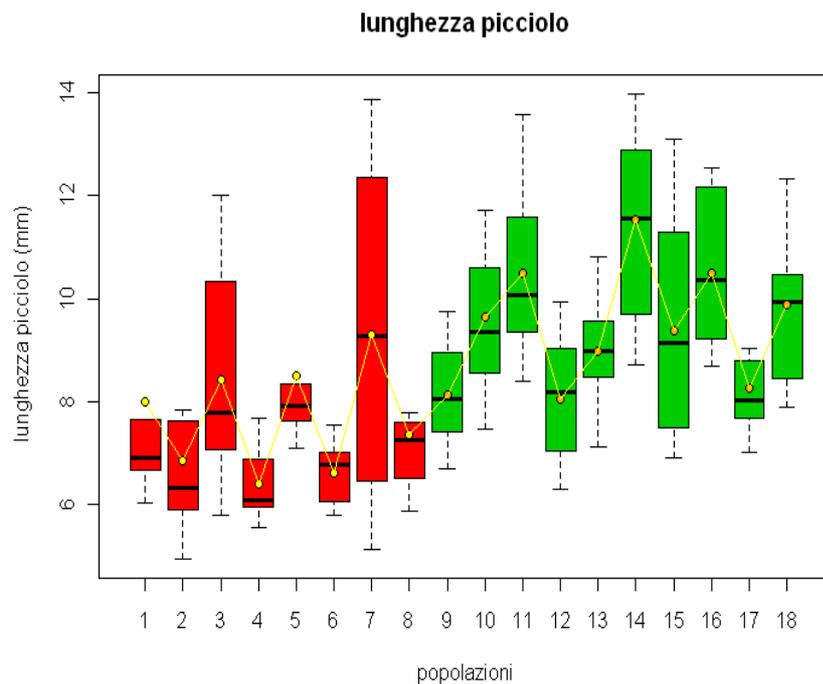


Fig. 30 Boxplot (vedi paragrafo. 3.4 pag. 26) della lunghezza del picciolo nelle popolazioni (in nero la mediana, in giallo la media, in rosso le popolazioni della subsp. *spinosa*, in verde quelle della subsp. *rupestris*)

La presenza di stipole retrorse di lunghezza superiore ai 2 mm, più o meno decorrenti alla base e di consistenza spinosa, è caratteristica di tutte le popolazioni della subsp. *spinosa*, compresi tutti i fenotipi intermedi rinvenuti all'interno di queste (Fig. 31).

Per quanto riguarda le popolazioni della subsp. *rupestris* le stipole sono nella maggior parte dei casi assenti o comunque setacee, generalmente di lunghezza inferiore ai 2 mm e precocemente caduche nella stagione vegetativa. I fenotipi intermedi presentano

invece per la maggior parte stipole spinose, retrorse, ben evidenti e persistenti (Fig. 32, 33), soltanto in alcuni casi setacee. Le coltivate di Pantelleria non presentano stipole, ad eccezione di due individui del biotipo "Spinosa di Pantelleria" (vedi Fig. 3, pag.5), che le hanno ben sviluppate retrorse e persistenti. La maggior parte delle piante coltivate di Salina, del biotipi "Nocella" presentano stipole spinose (vedi Fig. 4, pag.5), ben evidenti ma principalmente diritte e dalla consistenza in alcuni casi tendente al setaceo. Le piante di "Spinoso di Salina", invece presentano stipole spinose, ben evidenti retrorse e coriacee. Infine le popolazioni spontanee di entrambe le isole, così come quelle di Lampedusa, non presentano stipole spinose e hanno una morfologia chiaramente inquadrabile nell'ambito delle popolazioni siciliane della subsp. *rupestris*.



Fig. 31 Particolare di un fiore di una pianta della subsp. *spinosa*, con stipole tipiche retrorse ben evidenti alla base del peduncolo florale (la foglia è stata asportata)



Fig. 32 Particolare delle stipole marcatamente retrorse di un individuo intermedio della popolazione di Leonforte (CC-LEO)



Fig. 33 Particolare di un individuo dal fenotipo intermedio di Barcarello

## Analisi multivariata

L'analisi delle componenti principali con gli indici di morfologia fogliare e la lunghezza delle stipole evidenzia due gruppi, corrispondenti alle due sottospecie, che si separano abbastanza chiaramente lungo il primo asse principale che spiega il 47% della varianza. Il secondo asse principale che spiega il 33% della varianza, non evidenzia nessun gruppo di popolazioni in particolare (Fig. 34). Tra i due gruppi, maggiormente sovrapposto lungo il primo asse principale con gli individui della subsp. *rupestris*, vi è il gruppo di individui dai caratteri morfologici intermedi. Tra i caratteri morfologici qualitativi, quelli che hanno il più alto potere risolutivo nel differenziare le due sottospecie sono la forma della base della foglia cordata o troncata, la caratteristica del picciolo solcato e le ramificazioni. Infatti sovrapponendo alla matrice dei dati quantitativi quella dei dati qualitativi si possono osservare dei pattern simili (Fig. 35). La lunghezza delle stipole (Ls), ed il rapporto (y) tra la lunghezza della foglia (LF) e quella del picciolo (LP) sono le due variabili che contribuiscono maggiormente a differenziare i due taxa.

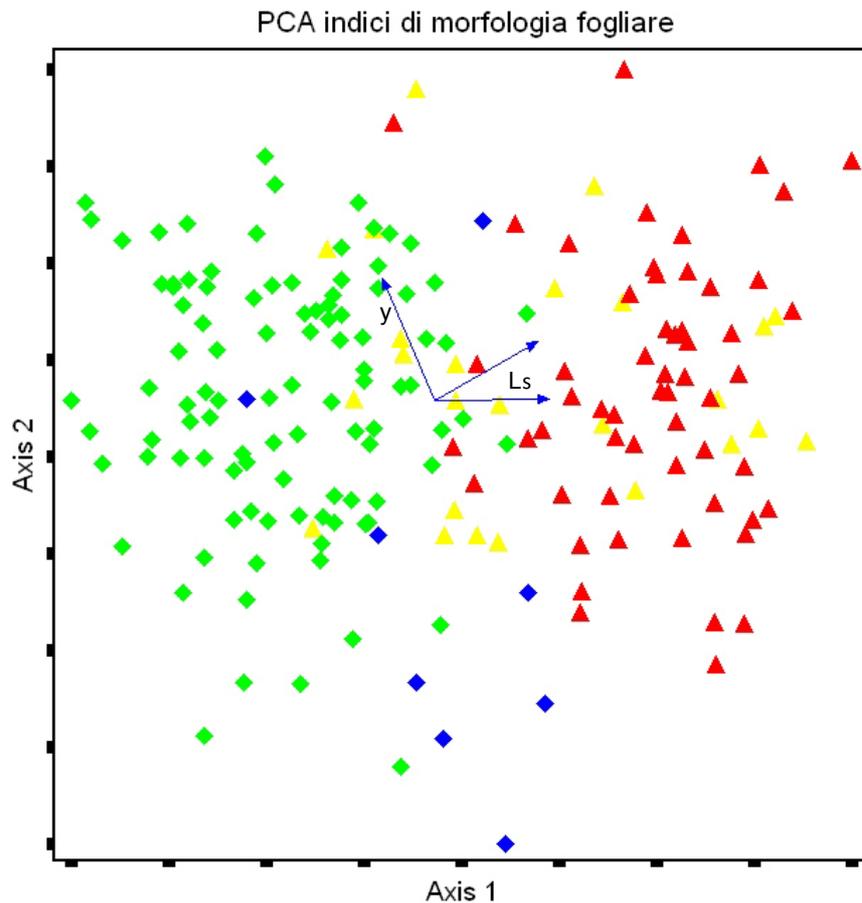


Fig. 34 PCA degli indici di morfologia fogliare e della lunghezza delle stipole. ▲ individui della subsp. *spinosa*, ◆ individui della subsp. *rupestris*, ▲ individui intermedi rinvenuti nelle zone di contatto, ◆ individui intermedi rinvenuti all'interno di popolazioni isolate. Ls = lunghezza delle stipole, y = LF/LP.

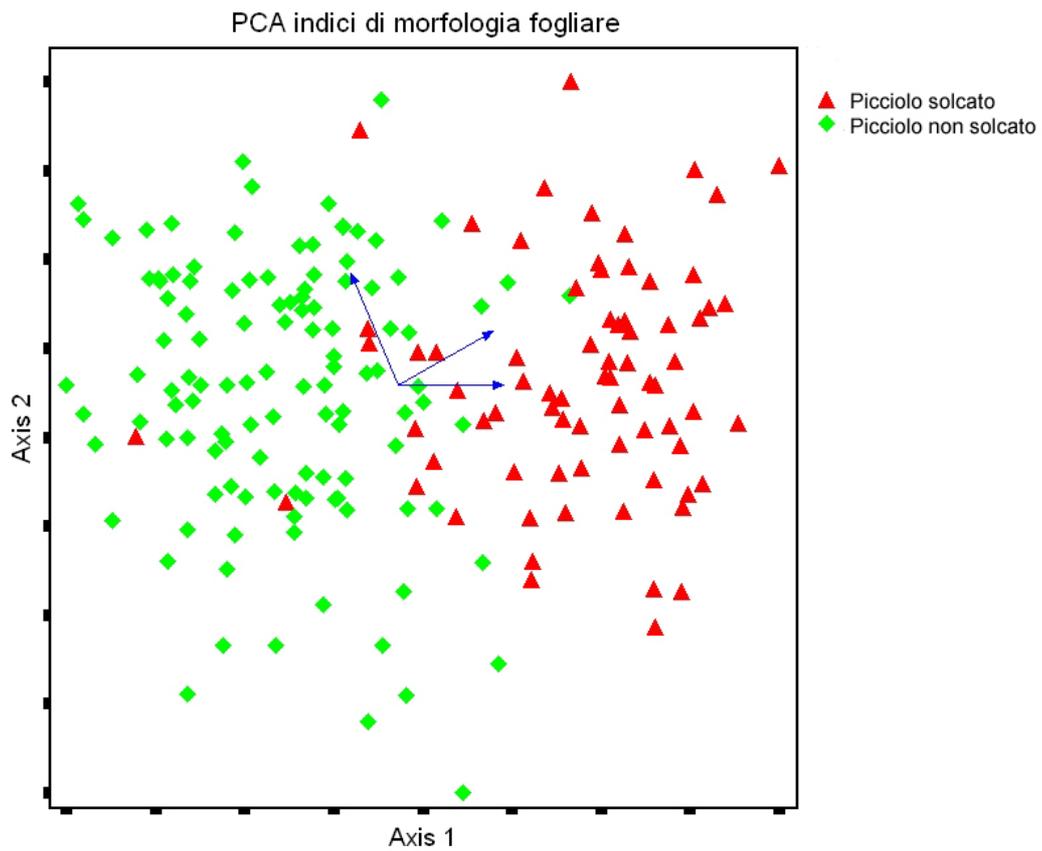


Fig. 35 PCA degli indici di morfologia fogliare e della lunghezza delle stipole, con gli individui colorati in base alla presenza ▲/assenza ◆ del picciolo solcato.

## CARATTERIZZAZIONE GENETICA

### 4.3 Analisi dei pattern genetici

L'utilizzo di 6 primer ISSR ha permesso l'individuazione di 47 bande ben evidenti. I frammenti amplificati hanno dimensioni comprese tra 250 coppie di basi (bp) (primer CSR4) e 1200 bp (primer CSR1) circa. Il numero di bande ottenute con ciascun primer varia da 6 (CSR5) a 10 (CSR1), con una media di 7,8 bande per primer. Non è stata evidenziata nessuna banda esclusiva a livello di popolazione.

I due primers CSR2 e CSR4 sono risultati dei buoni marcatori poiché permettono di discriminare le popolazioni delle due sottospecie. In particolare con il primer CSR2 è stata identificata una banda specifica di circa 740 bp (Fig. 36) caratteristica di tutte le popolazioni della subsp. *rupestris* analizzate, mentre con il primer CSR4 una banda specifica di circa 250 bp (Fig. 37) che è caratteristica delle popolazioni della subsp. *spinosa*.

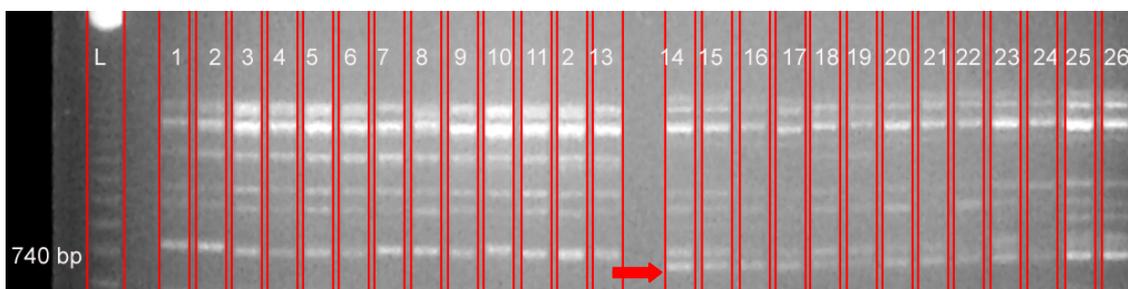


Fig. 36 Profili elettroforetici delle popolazioni di CC-PCA (1-13) e CR-LEO (14- 26) con il Primer CSR2. Evidente sulla destra (freccia) la banda caratteristica della subsp. *rupestris* a 740 bp (14- 26) (L = Ladder 123 bp; i campioni 2, 4, 6 e 15,17 e 19 sono rispettivamente repliche di 1, 3, 5 e 14, 16 e 18)

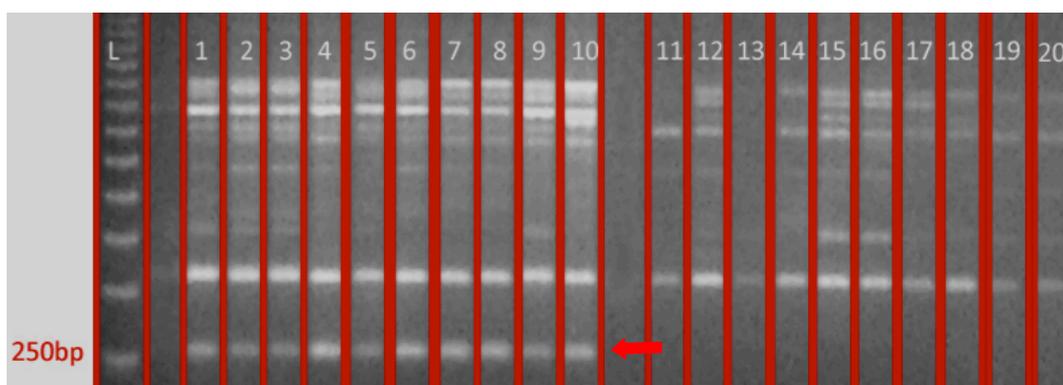


Fig. 37 Profili elettroforetici delle popolazioni di CC-MIL (1-10) e CR-ACI (11- 20) con il Primer CSR4. Evidente sulla sinistra (freccia) la banda caratteristica della subsp. *spinosa* a 250 bp (1- 10) (L = Ladder 123bp)

Dei 33 individui selvatici risultati con fenotipo intermedio, e pertanto indicati come possibili ibridi durante il campionamento, 26 (79%) possiedono un genotipo ibrido che presenta entrambe le bande specifiche. Di questi 26 individui 7 (6 a Barcarello ed 1 a Torremuzza) si trovano in popolazioni isolate rispetto a popolazioni dell'altra sottospecie. Inoltre fanno eccezione poiché non presentano la doppia banda pur essendo stati

individuati come fenotipi intermedi, soltanto 7 campioni. Di questi, 6 si rinvennero all'interno di popolazioni della subsp. *spinosa* (CC-Sic e CC-Leo) e non hanno la banda della subsp. *rupestris* e 1 si rinviene in una popolazione della subsp. *rupestris* (CR-LAR) e non ha la banda della subsp. *spinosa*.

Tutte le piante spontanee e coltivate di Pantelleria e Salina presentano la banda caratteristica associata alla subsp. *rupestris*. Rispettivamente soltanto 4 individui coltivati di Salina e 2 di Pantelleria con fenotipo intermedio, presentano anche la banda associata alla subsp. *spinosa*. I due individui di Pantelleria appartengono al biotipo "Spinoso di Pantelleria", quelli di Salina invece appartengono sia alla forma "Spinoso di Salina" che alla "Nocella". Anche per questi casi come per Barcarello e Torremuzza è difficile immaginare fenomeni naturali di ibridazione. I genotipi dell'"outgroup" di Roma presentano come previsto soltanto la banda caratteristica della subsp. *rupestris* identificata con il primer CSR2 mentre quelli dell'"outgroup" della Cina presentano soltanto la banda caratteristica della subsp. *spinosa* identificata con il primer CSR4. Per quanto riguarda l'"outgroup" di Cipro 4 genotipi su 5 presentano entrambe le bande caratteristiche delle due sottospecie, mentre uno presenta soltanto la banda della subsp. *rupestris*.

#### 4.4 Diversità genetica intra- ed interpopolazione

Dei 47 loci individuati 45 sono risultati polimorfici (97,5%). Le popolazioni della subsp. *spinosa* mostrano una percentuale media di loci polimorfici (% PL) maggiore (53%) di quella delle popolazioni della subsp. *rupestris* (47%). Infatti le popolazioni della subsp. *spinosa*, fatta eccezione per la popolazione di Ponte Cinque Archi che ha una bassa percentuale di polimorfismi (27%), hanno tutte una percentuale superiore o uguale al 50 %, con picchi del 70 % nella popolazione di Milena, del 60 % a Leonforte e del 57% a Cammarata e Siculiana (Fig. 38). Le popolazioni della subsp. *rupestris* mostrano in gran parte una percentuale di polimorfismi inferiore al 50%, con la popolazione di Cefalù che ha solo il 32%, mentre Leonforte, Barcarello e le coltivate di Pantelleria raggiungono rispettivamente il 55, 57 ed il 76% di loci polimorfici.

Per quanto riguarda le entità coltivate nelle isole si nota come le coltivate di Salina abbiano un numero notevolmente più basso di polimorfismi rispetto a quelle di Pantelleria (rispettivamente il 36 contro il 55 %), mentre le popolazioni selvatiche delle stesse isole hanno la stessa percentuale di polimorfismi.

L'indice di Shannon (I) (Fig. 39) mostra un andamento paragonabile alla percentuale di loci polimorfici, ma l'ordine con cui si dispongono le popolazioni in base alla diversità non coincide. Le popolazioni della subsp. *spinosa* mostrano quindi una maggiore diversità genetica (0,28) rispetto alle popolazioni della subsp. *rupestris* (0,25). A livello delle singole popolazioni si evidenzia che quelle con la maggiore diversità genetica nella subsp. *spinosa* sono Milena (0,40) e Leonforte (0,31), con Ponte cinque Archi (0,14), che risulta essere sempre la meno differenziata. Nella subsp. *rupestris* Barcarello (0,41) e Leonforte (0,31) restano sempre quelle con la maggiore diversità. Le coltivate di Pantelleria mostrano valori di diversità inferiori (0,24), mentre le selvatiche di Salina li hanno superiori (0,24). Il valore dell'indice di Shannon per la popolazione complessiva (0,25) indica un basso differenziamento.

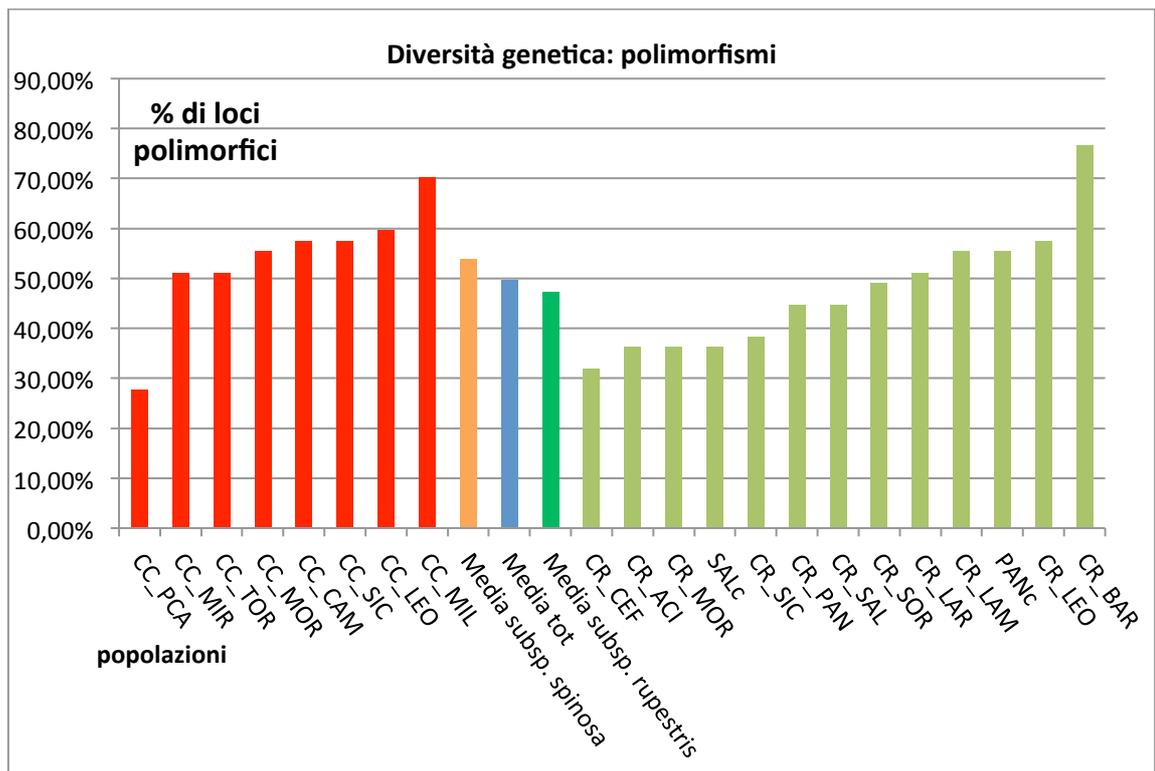


Fig.38 Percentuale di loci polimorfici nelle popolazioni dei due taxa: in rosso la subsp. *spinosa* ed in verde la subsp. *rupestris*

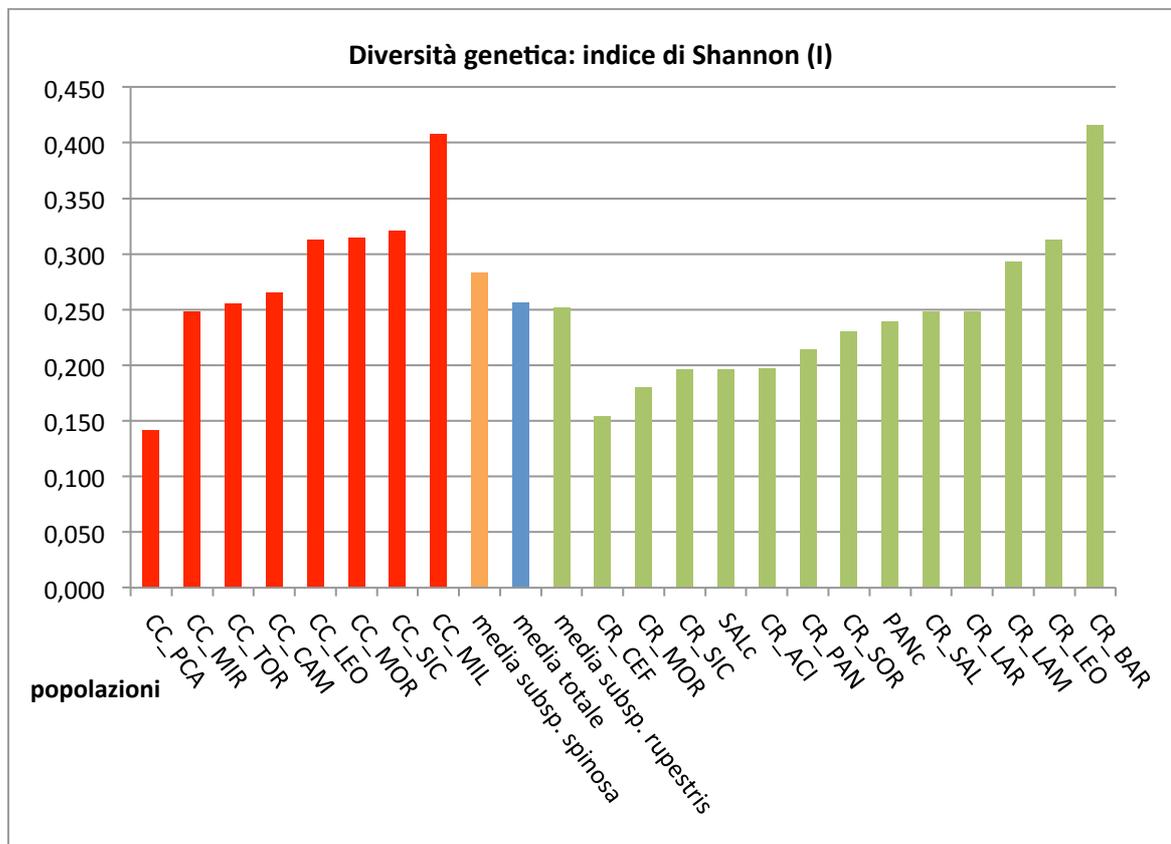


Fig.39 Valori dell'indice di Shannon per le popolazioni dei due taxa: in rosso la subsp. *spinosa* ed in verde la subsp. *rupestris*

Il flusso genico complessivo tra le popolazioni risulta elevato ( $N_m = 1,7$ ). I valori riscontrati per le due sottospecie evidenziano che all'interno della subsp. *spinosa* vi è un maggiore flusso genico ( $N_m = 1,1$ ) rispetto alla subsp. *rupestris* ( $N_m = 0,7$ ). I valori riscontrati sono comparabili con quelli di specie a strategia allogama o mista presenti in letteratura (MORJAN, 2004).

L'analisi della varianza molecolare complessiva e delle due sottospecie mostra delle differenze statisticamente significative ( $P = 0,01$ ) (Tab. 6). La diversità genetica complessiva è maggiore all'interno delle popolazioni ( $AP_T = 55\%$ ) piuttosto che tra le popolazioni ( $WP_T = 45\%$ ). La subsp. *spinosa* ha una maggiore variabilità intra-popolazione ( $WP_S = 76\%$ ) ed una variabilità tra popolazioni più bassa ( $AP_S = 24\%$ ). La subsp. *rupestris* ha una minore variabilità intra-popolazione ( $WP_R = 68\%$ ) ed una maggiore variabilità tra popolazioni ( $AP_R = 32\%$ ).

Tabella 6					
Analisi della varianza molecolare					
Totale					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Est. Var.</i>	%
$AP_T$	18	851,555	47,309	3,675	45%
$WP_T$	203	919,887	4,531	4,531	55%
Totale	221	1771,441		8,206	100%
Stat	<i>Value</i>	<i>P</i>			
PhiPT	0,448	0,010			
Subsp. <i>spinosa</i>					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Est. Var.</i>	%
$AP_S$	7	144,781	20,683	1,488	24%
$WP_S$	78	366,847	4,703	4,703	76%
Totale	85	511,628		6,191	100%
Stat	<i>Value</i>	<i>P</i>			
PhiPT	0,240	0,010			
Subsp. <i>rupestris</i>					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Est. Var.</i>	%
$AP_R$	12	307,597	25,633	2,034	32%
$WP_R$	123	542,991	4,415	4,415	68%
Totale	135	850,588		6,449	100%
Stat	<i>Value</i>	<i>P</i>			
PhiPT	0,315	0,010			
AP = tra popolazioni; WP = intra-popolazione; S= Subsp. <i>spinosa</i> , R = subsp. <i>rupestris</i> ;					

#### 4.5 Analisi delle coordinate principali degli individui

L'analisi delle coordinate principali (PCoA) delle distanze genetiche degli individui (Fig. 40) evidenzia la presenza di 3 gruppi che si separano abbastanza chiaramente lungo i due assi principali che spiegano rispettivamente il 52% ed il 13% della variabilità totale. Per

quanto riguarda il primo asse i due gruppi estremi rappresentano le due sottospecie: a sinistra tutti gli individui della subsp. *rupestris* che presentano la banda caratteristica identificata con il primer CSR2 (in verde), a destra la maggior parte degli individui della subsp. *spinosa* con la banda caratteristica identificata con il primer CSR4 (in rosso). Al centro appare un gruppo piuttosto eterogeneo che comprende la maggior parte degli individui con genotipo ibrido (in giallo quelli delle zone di contatto ed in blu quelli delle popolazioni isolate), e qualche individuo della subsp. *spinosa*. Gli individui intermedi della popolazione di Barcarello, fatta eccezione per due (in blu al centro), si posizionano più spostati verso il gruppo della subsp. *rupestris*, lungo il primo asse, e più in alto lungo il secondo asse, verso gli individui delle isole. L'unico individuo dai caratteri intermedi della popolazione isolata di Torremuzza, si posiziona nel gruppo di centro sovrapposto ad un individuo di Barcarello e vicino ad altri individui sempre intermedi di Leonforte, Siculiana e Milena. Il secondo asse evidenzia la all'interno del gruppo della subsp. *rupestris*, ben differenziato nella parte bassa del grafico, un sottogruppo con le popolazioni selvatiche e coltivate delle isole che formano un insieme abbastanza compatto (con qualche individuo di Barcarello nel mezzo), mentre la subsp. *spinosa* appare più raggruppata.

Inserendo nel calcolo delle distanze genetiche anche gli *outgroup* (Fig. 41) si nota che gli individui della Cina si posizionano vicino al gruppo della subsp. *spinosa*, lungo il primo asse, sebbene spostati verso il basso, lungo il secondo asse; gli individui di Cipro invece si trovano in corrispondenza del gruppo degli individui intermedi lungo il primo asse ma spostati molto più in basso lungo il secondo asse. Gli individui di Roma si trovano in mezzo al gruppo delle spontanee della subsp. *rupestris* e delle coltivate delle isole.

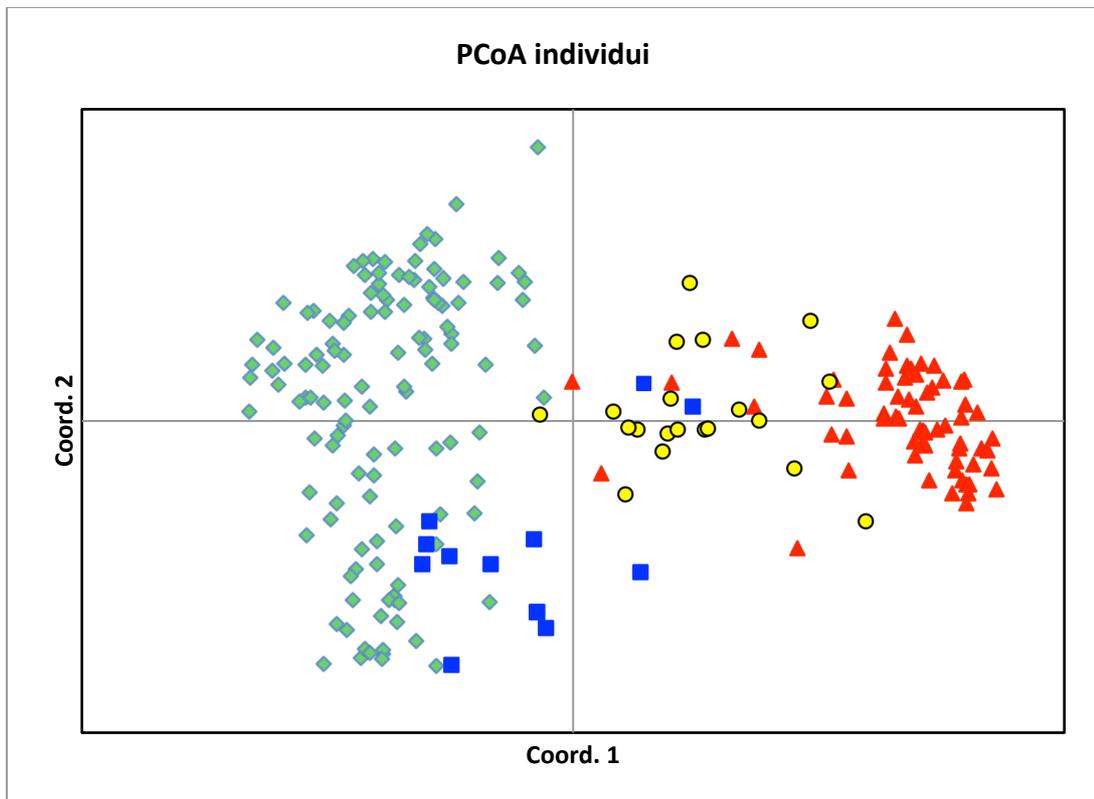


Fig. 40 PCoA degli individui delle popolazioni siciliane (distanze Euclidee).  
 ▲ subsp. *spinosa*, ● ibridi rinvenuti nelle zone di contatto, ◆ subsp. *rupestris*,  
 ■ ibridi rinvenuti nelle popolazioni isolate e ibridi coltivati. (Alcuni punti sono sovrapposti)

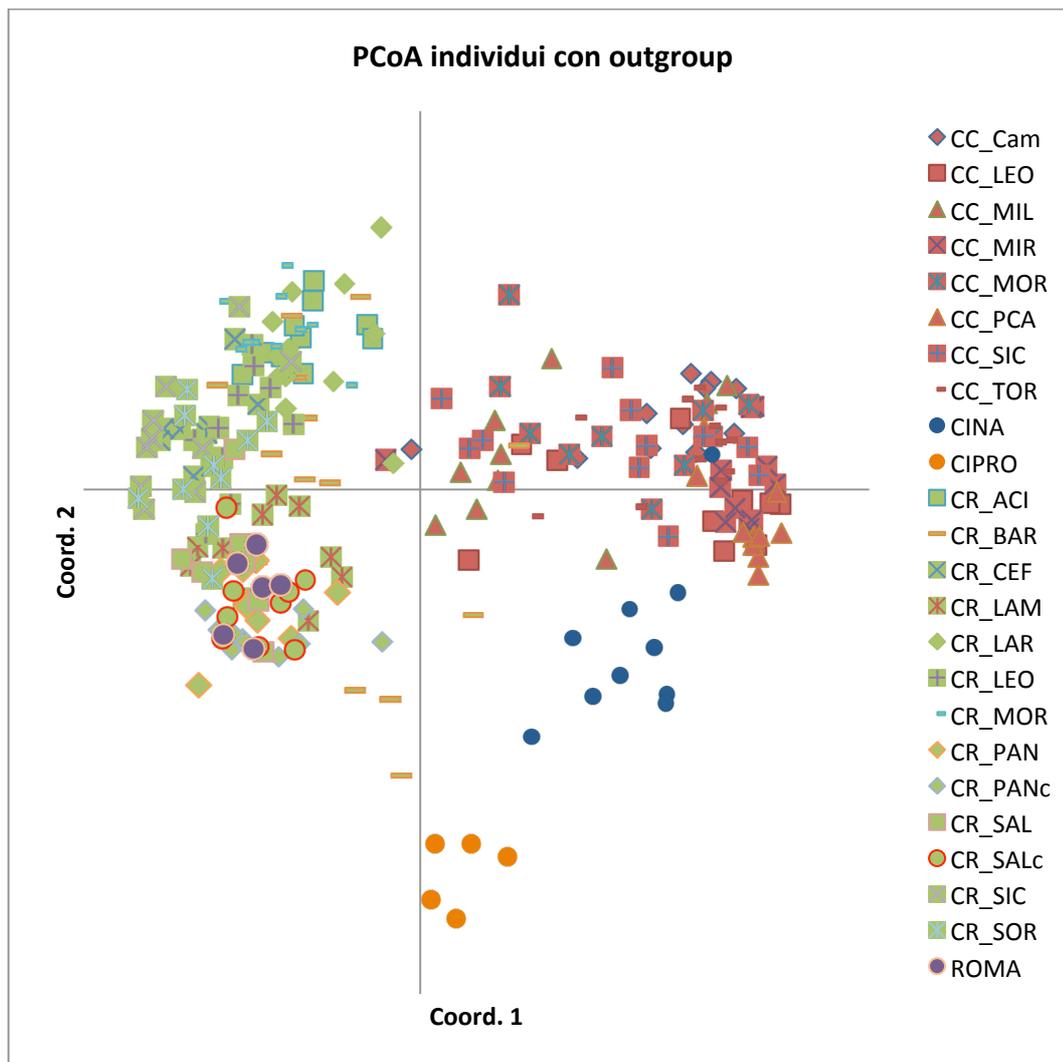


Fig. 41 PCoA degli individui (distanze Euclidee) inclusi gli "outgroup".  
 In rosso le popolazioni della subsp. *spinosa*, in verde le popolazioni della subsp. *rupestris*;  
 ● individui di Cipro, ● Cina e ● Roma.

#### 4.6 Analisi delle coordinate principali delle popolazioni

L'analisi delle coordinate principali delle popolazioni attraverso gli indici di identità/diversità genetica di Nei (1978) (Fig. 42), evidenzia due gruppi che comprendono tutte le popolazioni delle due sottospecie, che si separano nettamente lungo il primo asse principale che spiega il 53% della variabilità totale. Per quanto riguarda le due sottospecie, il secondo asse, che spiega il 19% della variabilità, permette di evidenziare dei sottogruppi all'interno della subsp. *rupestris*. Le popolazioni selvatiche delle isole circumsiciliane e delle coltivate formano un insieme abbastanza ben differenziato nella parte alta del grafico, la popolazione di Barcarello appare isolata al centro più spostata a destra lungo il primo asse, e tutte le altre popolazioni siciliane sono localizzate in basso. La subsp. *spinosa* appare più raggruppata lungo il secondo asse, mentre il primo asse evidenzia due popolazioni, Milena e Ponte Cinque Archi rispettivamente, più isolate dalle altre, una all'estremità verso il quadrante occupato dalla subsp. *rupestris* e l'altra all'opposto. La prima rappresenta una delle popolazioni più eterogenee con individui dalle caratteristiche fenotipiche molto particolari, mentre la seconda rappresenta la popolazione più isolata e dai caratteri più puri.

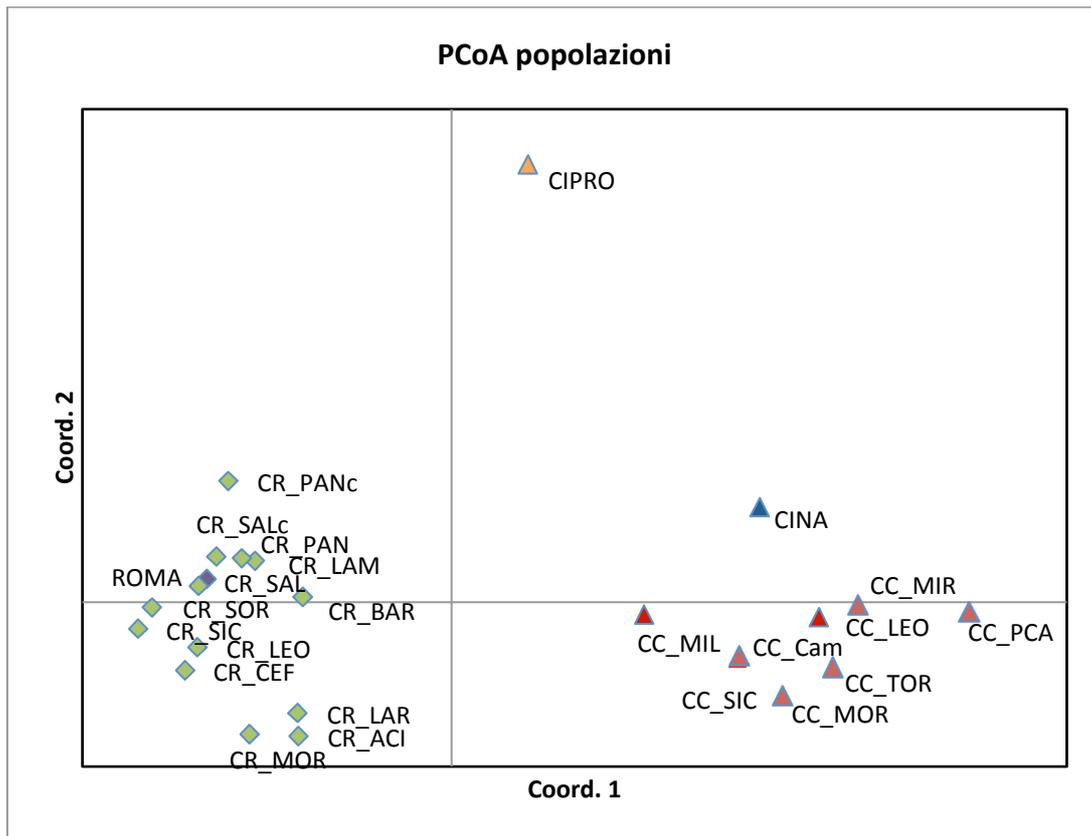


Fig. 42 PCoA delle popolazioni (indici di identità/ diversità genetica di Nei).

◆ popolazioni della subsp. *rupestris*, ▲ popolazioni della subsp. *spinosa*,  
 ▲ popolazione di Cipro, ▲ Cina, ◆ Roma.

L'*outgroup* di Roma si posiziona pienamente all'interno delle popolazioni siciliane della subsp. *rupestris* lungo il primo asse, ed in particolare vicino alla popolazione selvatica di Salina, comunque all'interno del gruppo delle isole minori evidenziato dal secondo asse.

L'*outgroup* della Cina si posiziona nella PCoA lungo il primo asse dal lato della subsp. *spinosa* in mezzo al gruppo, mentre il secondo asse lo differenzia dalle popolazioni siciliane.

L'*outgroup* di Cipro invece, si posiziona in maniera piuttosto ambigua lungo il primo asse, in mezzo ai due gruppi delle due sottospecie siciliane, e molto distante da entrambi i gruppi lungo il secondo asse.

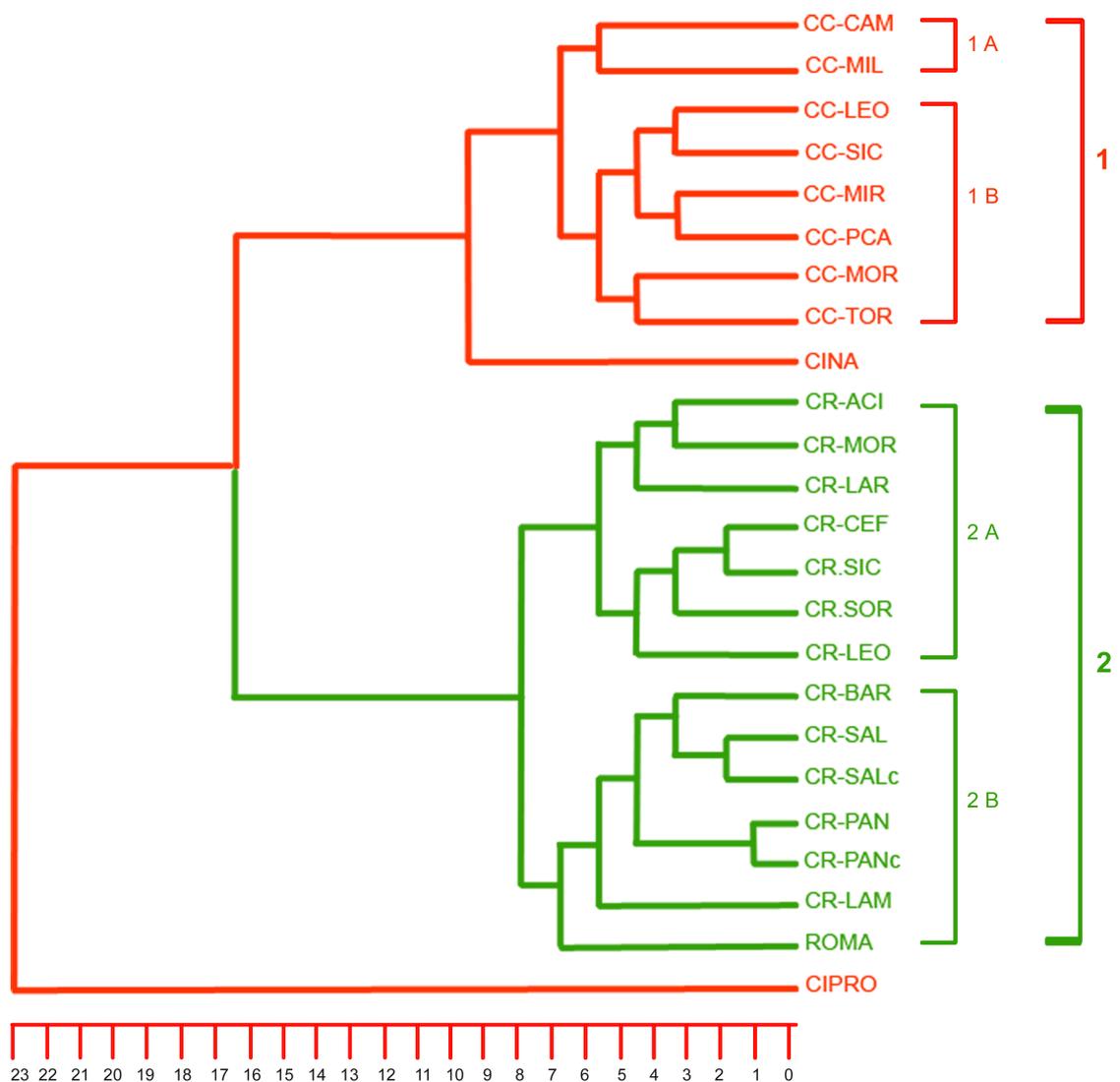


Fig.43 Dendrogramma basato sulle distanze genetiche di Nei secondo il metodo UPGMA.

Il dendrogramma mostra in maniera più chiara le relazioni tra le popolazioni già delineate dalla PCoA, differenziando due cluster principali che rappresentano le due sottospecie ed un outgroup costituito dalla popolazione di Cipro. All'interno del cluster della subsp. *spinosa* (1) si evidenziano l' outgroup della Cina che si colloca a parte e due sub-cluster principali, uno costituito dalle popolazioni di Milena e Cammarata (1A) e l'altro dalle restanti popolazioni (1B). All'interno del cluster della subsp. *rupestris* (2) si evidenziano due sub-cluster, uno con le popolazioni selvatiche e coltivate delle isole che comprende anche Barcarello e l'outgroup di Roma (2B), ed uno che comprende tutte le altre popolazioni siciliane (2A).

## 5. Discussioni

La caratterizzazione genetica e morfologica delle popolazioni siciliane di *C. spinosa* ha fornito dei dati chiari che evidenziano lo stato del gruppo nell'isola e che rispondono ai quesiti posti all'inizio di questa ricerca.

### 5.1 Ecologia e morfologia

Sulla base delle osservazioni di campo l'auto-ecologia dei due taxa appare ben differenziata. La subsp. *spinosa* colonizza una minore varietà di substrati, predilige infatti suoli argillosi ricchi in sali e non è presente sui substrati vulcanici. Essa mostra comunque una maggiore capacità di adattamento all'habitat poiché è capace di colonizzare anche gli ambienti rocciosi e soprattutto ambienti disturbati come i campi coltivati, dove localmente viene considerata una infestante, oltre che bordi strada, muri di contenimento stradale e massicciate ferroviarie. La subsp. *rupestris* mostra invece una grande capacità di adattamento in termini di tipologie di substrato essendo diffusa su calcari, arenarie, gessi, substrati vulcanici, ma è legata esclusivamente all'ambiente rupestre o comunque roccioso, inclusi gli ambienti antropici, quali vecchi muri.

I fenotipi intermedi da un punto di vista morfologico non hanno caratteristiche distintive rispetto ai due taxa ed il notevole grado di rimescolamento dei caratteri rispetto ai parentali non consente di attribuirli con certezza ad uno dei due taxa. Da un punto di vista ecologico sono legati principalmente ad ambienti di transizione tra le rupi e le argille e ad habitat secondari come muri e bordi strada.

Per quanto riguarda il portamento si nota una notevole plasticità, infatti in entrambe le sottospecie troviamo esemplari che hanno portamento pendulo, procombente, e procombente/eretto. L'habitus procombente prevale comunque nella subsp. *spinosa*, mentre quello pendulo è tipico nella subsp. *rupestris*, soprattutto negli individui che colonizzano l'habitat rupestre, ma nelle aree di contatto tra le argille e gli ambienti rupestri o rocciosi dove i due taxa convivono non è più un buon carattere per distinguerli. Le piante coltivate di Salina hanno un caratteristico portamento procombente eretto che è un buon carattere distintivo, mentre quelle di Pantelleria sono più prostrate.

Per quanto riguarda il morfotipo fogliare le principali differenze tra la subsp. *spinosa* e la subsp. *rupestris* rispettivamente si possono riassumere così: lamina più stretta affusolata/ lamina più ampia; picciolo corto, lineare ed esile/ picciolo più lungo, robusto e contorto; foglia di consistenza erbacea/ foglia cuoiosa- carnosa; base della foglia troncata sub-troncata/base cordata sub-cordata; stipole spinose, retrorse/ stipole assenti, caduche o vestigiali di consistenze setacea, raramente spinose.

I risultati delle analisi dei caratteri morfologici ed ecologici di tutte le popolazioni esaminate mostrano chiaramente l'esistenza di due gruppi ben distinti che risultano ben differenziati e corrispondono alla subsp. *spinosa* e alla subsp. *rupestris*, e di un gruppo piuttosto eterogeneo dalle caratteristiche intermedie di probabile origine ibrida.

I parametri morfologici utilizzati relativi alla lamina fogliare (W1, W2 e W3) descrivono adeguatamente le differenze tra le due sottospecie, ed unitamente alla lunghezza del picciolo, la presenza in esso di un solco centrale, la presenza e la consistenza delle stipole e le ramificazioni costituiscono dei buoni caratteri tassonomici.

## 5.2 Caratterizzazione genetica

I marcatori molecolari ISSR utilizzati sono risultati molto polimorfici ed hanno permesso di individuare due bande specifiche caratteristiche delle due sottospecie e di discriminare altrettanto bene le popolazioni dei due taxa separandole in due gruppi ben distinti. I due gruppi coincidono con quelli identificati con l'analisi morfologica e rappresentano chiaramente le due sottospecie. Inoltre è stato possibile discriminare un terzo gruppo abbastanza eterogeneo in posizione intermedia tra gli altri due ma chiaramente distinguibile, costituito da individui selvatici che possiedono un genotipo ibrido associato ad un fenotipo intermedio.

I valori dell'indice di Shannon per le due sottospecie indicano che la subsp. *spinosa* mostra una maggiore diversità genetica rispetto alle subsp. *rupestris*. A livello delle singole popolazioni invece si evidenzia che quelle con la maggiore diversità genetica nella subsp. *spinosa* e nella subsp. *rupestris* sono rispettivamente Milena e Barcarello, quelle con la minore diversità invece Ponte cinque Archi e Cefalù. Le popolazioni selvatiche di Pantelleria e Salina hanno valori di diversità simili. I valori di diversità delle popolazioni coltivate riflettono le differenti tecniche di propagazione in coltura adottate nelle due isole. Infatti le coltivate di Pantelleria, propagate per seme, mostrano valori superiori alle coltivate di Salina, che sono propagate per via vegetativa.

Il valore elevato del flusso genico complessivo evidenzia il fatto che vi sono degli scambi genetici tra i due taxa (principalmente nelle zone di contatto) e giustifica la loro bassa differenziazione genetica indicata dal basso valore dell'indice di Shannon per la popolazione complessiva. Il dato è ulteriormente confermato dall'analisi della varianza molecolare che evidenzia una distribuzione della diversità genetica, maggiore all'interno delle popolazioni piuttosto che tra di esse.

L'analisi della varianza molecolare e del flusso genico all'interno delle due sottospecie evidenzia che all'interno della subsp. *spinosa* vi è un minore differenziamento tra le popolazioni che corrisponde ad un flusso genico più elevato. All'interno della subsp. *rupestris* invece si nota un maggiore differenziamento associato a livelli minori di flusso genico. Questi risultati sono concordanti con la distribuzione dei due taxa nell'isola. Infatti la subsp. *spinosa* ha una distribuzione pressoché continua all'interno della serie Gessoso-Solfifera e quindi una maggiore connessione tra le popolazioni che ne favorisce gli scambi genetici. La subsp. *rupestris*, ha invece una distribuzione più ampia ma discontinua, e le popolazioni sono spesso isolate in aree costiere rocciose e rupi costiere ed interne. La PCoA degli individui mette in risalto l'eterogeneità del gruppo degli ibridi che corrisponde alla notevole variabilità fenotipica riscontrata.

Le relazioni esistenti tra le popolazioni delle due sottospecie e con gli *outgroup* vengono mostrate chiaramente dal dendrogramma e dalla PCoA. Questi evidenziano i due cluster ben distinti corrispondenti alle due sottospecie. Le popolazioni spontanee e coltivate delle isole costituiscono un sottoinsieme distinto all'interno del cluster della subsp. *rupestris*. Questo dato è importante perché indica che i marcatori individuati possono essere utilizzati con buona approssimazione per il riconoscimento dei capperi commerciali provenienti da queste aree. La popolazione di Roma appartiene chiaramente al taxon della subsp. *rupestris*, ed in particolare rientra nel cluster più affine alle popolazioni spontanee e coltivate delle isole. La popolazione della Cina rientra nel gruppo della subsp. *spinosa* e appare poco differenziata dalle popolazioni siciliane, se si considera la notevole distanza geografica. La

popolazione di Cipro invece appare chiaramente differenziata da entrambi i gruppi delle popolazioni siciliane.

### 5.3 Ibridi

Grazie all'individuazione delle due bande specifiche per le due sottospecie è stato possibile dimostrare da un punto di vista genetico l'esistenza di fenomeni di ibridazione tra i due taxa nelle zone di contatto, come ritenuto ipoteticamente da ZOHARY (1960) ed INOCENCIO *et al.* (2006). Tra tutti gli individui analizzati indicati come possibili ibridi, soltanto quelli che presentano un fenotipo intermedio associato ad un genotipo ibrido (78%), possono essere considerati con sicurezza degli ibridi tra le due sottospecie. Per quanto riguarda questi individui con genotipo e fenotipo ibrido presenti in popolazioni isolate è difficile ipotizzare fenomeni naturali di ibridazione, e si possono ipotizzare a livello speculativo fenomeni di importazione di materiale da altre aree ad opera dell'uomo o di arrivo casuale di seme a seguito di dispersione a grande distanza ad esempio ad opera di uccelli (HÓDAR, 1994; VAN HEEZIK & SEDDON, 1999). Entrambe le ipotesi sono possibili a Barcarello, poiché nell'area è difficile ipotizzare in passato la presenza della subsp. *spinosa*. Comunque poiché l'area in passato era soggetta a coltivazione (come testimoniato dalla presenza di muri a secco lungo il sentiero e il costone roccioso della riserva di Capo Gallo) non è improbabile che qualche agricoltore abbia introdotto piante provenienti da altre aree per poi raccogliergli i boccioli. Per l'unico esemplare ibrido di Torremuzza, data la presenza nella zona di popolazioni della subsp. *rupestris*, comunque molto isolate da quella in esame, si può presumere che in tempi precedenti il taxon fosse presente ad esempio lungo i muri a secco della zona e poi successivamente scomparso lasciando però qualche "traccia", o propendere per l'ipotesi dell'arrivo casuale dei semi.

Per gli individui con genotipo ibrido delle forme coltivate l'ipotesi più probabile è quella dell'intervento dell'uomo; gli agricoltori infatti per scopi di miglioramento genetico possono avere modificato indirettamente le popolazioni delle isole importando semi e piante da altre aree, o in modo diretto con incroci tra piante autoctone a piante importate.

Infine per i fenotipi intermedi che non presentano la doppia banda si può invece pensare ad effetti epigenetici, o ancora alla loro derivazione da rari individui eterozigoti per le bande specifiche.

### 5.4 Considerazioni tassonomiche e filogenetiche

In questa sede non è opportuno entrare nel merito della nomenclatura ma è importante esporre alcune considerazioni in base ai recenti studi pubblicati riguardanti il gruppo di *C. spinosa* L. (INOCENCIO *et al.* 2006, DANIN, 2010).

L'elevazione delle due sottospecie al rango specifico proposta da INOCENCIO *et al.* (2006) (*C. spinosa* subsp. *spinosa* var. *canescens* = *Capparis sicula* Veill. e *C. spinosa* subsp. *rupestris* = *Capparis orientalis* Veill.) appare abbastanza supportata in Sicilia dal differenziamento ecologico, genetico e morfologico evidenziato tra i due taxa con questa ricerca. Tuttavia in base ai risultati ottenuti, la classificazione delle forme coltivate all'interno di una terza specie, riferita da questi autori a *C. spinosa* L. non è valida per la Sicilia. Infatti le forme coltivate a Pantelleria e Salina mostrano un stretta somiglianza genetica con le forme selvatiche presenti e sono geneticamente affini alla subsp. *rupestris*. Inoltre a livello speculativo si potrebbe ipotizzare, data l'affinità genetica tra le popolazioni selvatiche e

coltivate, soprattutto quelle delle isole, con quella di Roma, che vi siano stati degli scambi di materiale genetico tra le popolazioni del continente e quelle isolane, che potrebbero anche essere imputati ai Romani. I marcatori ISSR utilizzati in questo studio e quelli cloroplastici (cpSSR) precedentemente sviluppati (SIRAGUSA & CARIMI, 2009) potrebbero essere utilizzati per realizzare un studio più dettagliato sull'origine delle forme coltivate e sulla filogenesi del gruppo di *C. spinosa* L. e fornire dati utili per supportare questa ipotesi.

Da buon naturalista, dopo essermi interrogato durante lo svolgimento di questa ricerca sulla storia naturale del gruppo ho formulato le seguenti ipotesi filogenetiche sulla base dei risultati ottenuti.

I dati molecolari indicano con buona approssimazione che le due sottospecie hanno avuto origine da un antenato comune e si sono differenziate in tempi relativamente recenti. La prima ipotesi, basata sui dati ecologici e molecolari ottenuti, è che l'origine dei due taxa sia dovuta ad un processo di speciazione ecologica a partire da un ceppo ancestrale xerotropicale simile alle attuali entità associate agli ambienti rocciosi (Fici, 2001). A partire da questo ceppo, si sarebbero differenziati quindi in ambienti di transizione, come aree rocciose costiere e interne, due linee con trend evolutivi divergenti, una con caratteri più ancestrali, più specializzata in ambiente rupestre (subsp. *rupestris*) ed una più derivata specializzata in habitat argillosi salini. Questa ipotesi potrebbe essere supportata dalla presenza di individui con la doppia banda in zone isolate. Infatti se alternativamente all'ipotesi proposta, si considera la presenza della doppia banda in popolazioni isolate, come un carattere ancestrale presente nel ceppo originario da cui si sono differenziati i due taxa esaminati (e probabilmente anche le altre entità presenti nella regione mediterranea e nord africana), questi individui potrebbero essere i superstiti di questo gruppo ancestrale ormai scomparso, almeno in Sicilia. L'ancestrale potrebbe corrispondere a *C. spinosa* var. *aegyptia* (Lam.) Boiss. specie di antica derivazione africana come indicato da ZOHARY (1960). Questo taxon mostra infatti un'ampia variabilità che comprende quasi tutta la gamma di variazioni presente all'interno del gruppo di *C. spinosa* L. ed è presente in: Marocco, Algeria, Tunisia, Tripolitania, Egitto, Palestina, Libano, Turchia, Creta, Iran e Afghanistan.

La seconda ipotesi è quella che riguarda l'origine delle popolazioni cinesi. I risultati molecolari sono stati abbastanza sorprendenti, infatti nonostante la notevole distanza esistente, i genotipi analizzati sono molto simili a quelli siciliani della subsp. *spinosa*, fatto che implicherebbe una separazione abbastanza recente. L'origine di queste popolazioni potrebbe dunque essere legata al trasporto da parte dell'uomo di semi dalle originali aree di distribuzione del mediterraneo o del medio oriente attraverso la via della seta, o comunque la pianta stessa da sola, data la sua elevata plasticità ecologica e le sua capacità di adattamento e dispersione, potrebbe aver sfruttato questo corridoio per colonizzare l'Asia centrale. Un dato a sfavore di questa ipotesi è che, in Cina per la specie viene riportato un numero cromosomico  $2n = 24$  (MINGLI & TUCKER, 2008) mentre per i capperi del mediterraneo e del medio oriente è noto un numero cromosomico  $2n = 38$  (DARLINTONG & WYLIE) Quest'ultimo dato sconvolgerebbe tutto il quadro delineato poiché a questo punto il ceppo cinese dovrebbe essere considerato quello ancestrale, in forte contrasto con la prima ipotesi, che riconosce il ceppo originario derivato dal gruppo dei "capperi" africani.

Si potrebbe allora concludere che il gruppo di *C. spinosa* sia in realtà di origine polifiletica con diversi ceppi ancestrali tropicali, sia Africani che Asiatici. Ulteriori indagini genetiche e tassonomiche sul gruppo in Cina e in Africa potrebbero fornire nuovi dati per verificare questa ipotesi.

## 6. Conclusioni

La presente ricerca ha permesso di confermare la presenza in Sicilia di due sottospecie: *Capparis spinosa* subsp. *spinosa* e *C. spinosa* subsp. *rupestris* ben distinte da un punto di vista ecologico, morfologico e genetico.

I parametri morfologici utilizzati, relativi all'habitus, alla foglia e alle stipole, descrivono adeguatamente le differenze tra le due sottospecie. La larghezza della lamina fogliare, la lunghezza del picciolo, la presenza in esso di un solco centrale, la presenza e la consistenza delle stipole e la ramificazione dell'apparato epigeo, costituiscono dei buoni caratteri tassonomici, adatti anche alla caratterizzazione dei fenotipi intermedi.

L'approccio multidisciplinare utilizzato ha permesso di caratterizzare le popolazioni siciliane fornendo i primi dati sulla genetica del gruppo di *C. spinosa* in Sicilia.

I marcatori molecolari ISSR hanno dimostrato un'elevata capacità di discriminazione delle popolazioni siciliane della subsp. *spinosa* e della subsp. *rupestris*, ed hanno dato buoni risultati anche con gli *outgroup* provenienti da aree geografiche diverse. Sono stati individuati due marcatori molecolari specifici per le due sottospecie. L'individuazione di questi marcatori, supportata dall'analisi morfologica, ci ha permesso di caratterizzare e classificare gli individui con fenotipi intermedi. Nella maggior parte dei casi è stato possibile dimostrare la natura ibrida di questi individui per la quale fino ad oggi non erano note prove sperimentali. In alcuni casi però non si esclude la presenza di fenomeni di importazione di piante o semi da altre aree, o fenomeni epigenetici.

Per quanto riguarda le forme coltivate di Pantelleria e Salina, i dati molecolari confermano la loro appartenenza alla subsp. *rupestris*.

L'individuazione dei due marcatori ha fornito inoltre un utile strumento da utilizzare in ricerche future per ricostruzioni filogenetiche sul genere *Capparis* L. e per il riconoscimento dei capperi commerciali.

*Capparis spinosa* L. è, come molte specie, un taxon di difficile delimitazione. Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro essa può essere considerata un buon modello per studiare i processi di ibridazione e di speciazione ecologica, passati e ancora in corso, che hanno determinato la diversità del gruppo nel Mediterraneo.

L'approccio multidisciplinare adottato, basato su osservazioni di campo, affiancate da analisi morfologiche e genetiche, se applicato su tutto l'areale di *C. spinosa*, potrebbe fornire un quadro chiaro e affidabile sulla reale diversità esistente e sulla filogenesi della specie.

## Ringraziamenti

Tantissime sono le persone che hanno contribuito direttamente o indirettamente alla realizzazione di questa ricerca e mi hanno aiutato e sostenuto durante questa avvincente e travagliata avventura nel mondo della biologia molecolare e del “cappero”, “pianta del millennio”. Spero pertanto di menzionarle tutte in questa appendice alla tesi, in segno di riconoscenza e a testimonianza di quanto sia importante la collaborazione tra le persone, lo scambio di idee e il confronto, in generale, e soprattutto nella ricerca. Per il supporto scientifico ringrazio il Dott. Mirko Siragusa, che mi ha guidato nel mondo della biologia molecolare fornendomi le basi teoriche e metodologiche ed insegnandomi le tecniche con grande professionalità. Il Prof. Silvio Fici per avermi introdotto allo studio di questa interessante quanto problematica pianta, per la sua pazienza e le discussioni costruttive. Il Dott. Francesco Carimi che ha creduto in me ed in questo progetto e ne ha reso possibile la realizzazione. Il Dott. Giuseppe Garfi ed il Dott. Roberto De Michele per gli utili consigli e la loro disponibilità. Il Prof. Olivier Honnay per i preziosi insegnamenti e per avermi fornito il programma per l’analisi multivariata. Per il resto ringrazio la mia famiglia, per la grande pazienza dimostrata ed il prezioso sostegno fisico e morale; in particolare ringrazio mio padre e mia sorella per avermi aiutato nelle 10.000 misurazioni morfologiche. I naturalisti Vincenzo, Silvio e Pietro per il supporto fornito durante il campionamento. Renzo per l’ospitalità e il supporto durante i miei sopralluoghi nell’isola di Pantelleria. Riccardo per l’ospitalità durante il campionamento nella Sicilia orientale e le interessanti discussioni sul lavoro di tesi. Tutti i miei parenti ed amici, per aver sopportato a turno discussioni interminabili e ripetute sui capperi. Il Prof. Marcenò per avermi trasmesso la passione per la botanica. I “Sopa de Mar”, che mi hanno accompagnato a suon di Musica Cubana durante gran parte del lavoro. I coltivatori di capperi, Vincenzo Culoma e Nicola Alberto Ponzio di Pantelleria e la Signora Rao di Salina, per i preziosi chiarimenti sui capperi coltivati, così come il Sig. Cappadona della Cooperativa Agricola Produttori Capperi di Pantelleria. Il Prof. Gianguzzi e il Prof. Romano per le interessanti escursioni e Fofò per la simpatia.

## Bibliografia

AKGUL A. & OZCAN M., 1999. Some compositional characteristics of capers (*Capparis* spp.) seed and oil, *Grasas Aceites*. 50 : 49-52.

BARBERA G., 1993. *Il Cappero*. Edagricole, Bologna.

BARBERA G., DI LORENZO R. & BARONE E., 1991. Observations on *Capparis* populations cultivated in Sicily and on their vegetative and productive behaviour. *Agricoltura Mediterranea* 121 : 32-39.

BARCACCIA G. & FALCINELLI M., 2006. *Genetica e genomica*, Vol.III *Genomica e biotecnologie genetiche*. Liguori editore, Napoli.

BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2008. *Chlamydotis undulata*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4., [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), Downloaded on 08 February 2011.

BOBROV E.G., 1970. *Capparis* L. In : BUSH N.A. *Flora of the USSR* vol. 8 : 3-5, Jerusalem.

BORNET B. & BRANCHARD M., 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.

BRULLO S., GIUSSO DEL GALDO G., MINISSALE P., SIRACUSA G. & SPAMPINATO G., 2002. Considerazioni sintassonomiche e fitogeografiche sulla vegetazione della Sicilia. *Boll. Acc. Gioenia Sc. Nat.* 35 (361) : 325-359.

BRULLO S., GUGLIELMO A. & PAVONE P., 1985 - La classe *Pegano-Salsoletea* in Sicilia. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat. Catania*, 18 (325) : 247-254.

CHASE M. W. & HILLS H. H., 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40 : 215-220.

DAFNI A., EISIKOWITCH D. & IVRI Y., 1987. Nectar flow and pollinators' efficiency in two co-occurring species of *Capparis* (Capparaceae) in Israel. *Pl. Syst. Evol.* 157 : 181-186.

DANIN A., 2010. *Capparis* in the East Mediterranean countries. *Fl. Medit.* 20: 179-185.

DARLINTONG C. D. & WYLIE A. P., 1955. *Chromosome atlas of flowering plants*. 2nd ed. Allen e Unwin, London.

DAVIS P. H., 1984. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 1. Edinburgh University Press.

DOYLE J.J. & DOYLE J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15.

EISIKOWITCH D., IVRI Y. & DAFNI A., 1986. Reward partitioning in *Capparis* spp. along ecological gradient. *Oecologia* 71 : 47-50.

- FANG D. Q. & ROOSE M. L., 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 408-417.
- FICI S., 2001. Intraspecific variation and evolutionary trends in *Capparis spinosa* L. (Capparaceae). *Plant Systematics and Evolution* 228 : 123–141.
- FICI I. S., 2003. The *Capparis spinosa* L. group (Capparaceae) in Australia. *Webbia* 58(1): 113-120.
- FICI S. & GIANGUZZI L., 1997. Diversity and conservation in wild and cultivated. *Capparis* in Sicily. *Bocconea* 7 : 437–443.
- FICI I. S. & LO VALVO F., 2004. Seed dispersal of *Capparis spinosa* L. (Capparaceae) by mediterranean lizards. *Natur. Sicil. S. IV, XXVIII* (3-4) : 1147-1154.
- FREELAND J. R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- GIANGUZZI L., ILARDI V. & RAIMONDO F.M., 1993. La vegetazione del promontorio di Monte Pellegrino. *Quad. Bot. Ambientale Appl.* 4 : 79-137.
- HALL J. C., SYTSMA K. J. & ILLIS H. H., 2002. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany* 89 (11) : 1826–1842.
- HANSEN J. M. *The Palaeoethnobotany of Franchthi Cave*. Bloomington: Indiana University Press; 1991.
- HEDGE I. & LAMOND J., 1970. Capparidaceae. In: Rechinger K.H. (ed.), *Flora Iranica* N. 68.
- HEIWOOD V.H., 1993. *Capparis* L. In : TUTIN T. et al., 1993 - *Flora Europaea*, vol.I, second edition. PSILLOTACEAE – PLATANACEAE. Cambridge University Press. pp.312
- HIGTON R.N. & AKEROYD J.R., 1991. Variation in *Capparis spinosa* L. in Europe. *Botanical Journals of the Linnean Society* 106 : 104–112.
- HÓDAR J. A., 1994. La alimentación de *Sylvia undata* y *Sylvia conspicillata* en una zona semiárida del sureste peninsular. *Ardeola* 41 : 55–58.
- HÓDAR J. A., CAMPOS F. & ROSALES B. A., 1996. Trophic ecology of the Ocellated Lizard *Lacerta lepida* in an arid zone of southern Spain: relationships with availability and daily activity of prey. *J. Arid Environm.*, 33 : 95–107.
- JANG H. E., LI X., ZHAO Y. X., FERGUSON D. K. , HUEBER F., BERA S., WANG Y.F., ZHAO L. C., LIU C. J. & LI C. J., 2006. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *Journal of Ethnopharmacology* Volume 108, Issue 3 : 414-422.
- JANG H. E., LI X., ZHAO Y. X., FERGUSON D. K. , WANG Y.F., LIU C. J. & LI C. J., 2007. The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications *Journal of Ethnopharmacology*, 113 : 409–420.

- JIMÉNEZ A., 1987. A new species of caper. *Isozyme* Bul.20: 28
- INOCENCIO C., COWAN R. S., ALCARAZ F., RIVERA D. & FAY M. F., 2005. AFLP fingerprinting in *Capparis* subgenus *Capparis* related to the commercial sources of capers. *Genetic Resources and Crop Evolution* Volume 52, 2 : 137-144.
- INOCENCIO C., RIVERA D., OBÓN C., ALCARAZ F. & BARREÑA J., 2006. A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93 : 122–149.
- JACOBS M., 1965. The genus *Capparis* (Capparaceae) from the Indus to the Pacific. *Blumea* 12 : 385–541.
- KITAMURA S., 1964. *Plants of West Pakistan and Afghanistan*. Kyoto University.
- KHOULDI S., PAGNOTTA M.A., TANZARELLA O. A., GHORBEL A. & PORCEDDU E., 1999. Suitability of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique for estimating the genetic variation in natural genotypes of tunisian and italian caper (*Capparis spinosa* L.). *Agricoltura Meditteranea*, 129 : 89-94
- LEVINSON G. & GUTMAN G. A., 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4 : 203-211.
- LI VIGNI I. & MELATI M. R., 1999. Examples of seed dispersal by entomochory. *Acta Bot.Gallica* 146 :145–156.
- LUNA LORENTE F. & PÉREZ VICENTE M., 1985. *La tapenera* o alcaparra. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, Madrid, 125 pp.
- MC CUNE B., & MEFFORD M. J., 2006. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 5.10 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.
- MAIR, V. H. 1995. Prehistoric Caucasoid corpses of the Tarim Bassin. *J Indoeur. Stud.* 23 : 281–370.
- MAIRE R., 1965. *Flore de L'Afrique du Nord*, Vol. 12, éditions Paul Lechevalier, Paris.
- MARCOS SAMANIEGO N. & PAIVA J., 1993. In Castroviejo Bolibar, Santiago *et al.*, 2009 - Flora iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Plumbaginaceae (partim)- Capparaceae - Real Jardín Botánico, CSIC, Vol. III, Madrid.
- MEIKLE R. D., 1977. *Flora of Cyprus*, Vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew.
- MINGLI Z. & TUCKER G. C. 2008. Capparaceae: In *Flora of China* Vol. 7 pubblicata on line <http://www.efloras.org>
- MOUTERDE P., 1966. *Nouvelle flore du Liban et de la Syrie*. Editions de l'Imprimerie catholique, Beyrouth.
- NAN P., SHI S., PENG S., TIAN C. & ZHONG Y., 2003. Genetic Diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from Central and South-west China as Revealed by ISSR Markers *Annals of Botany* 91 (3) : 329-333.

- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106 : 283-392.
- NEI I, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89** : 583-590.
- OZENDA P., 1958. Flore du Sahara Septentrional et central, Paris.
- PEAKALL R, & SMOUSE P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PETANIDOU T. 1991. Pollination ecology in a phryganic ecosystem (in Greek, summary in English). Ph.D. thesis. Aristotelian University, Thessaloniki.
- PEETANIDOU T., VAN LAERE A. J. & SMETS E., 1996. Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Syst. Evol.* 199 : 79–92.
- POLUNIN O. & STANTON A., 1984. *Flowers of the Himalaya*. Oxford University Press.
- POTTIER-ALAPETITE G., 1979. Flore de la Tunisie, Angiospermes-dicotyledones. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.
- QUEZEL P. & SANTA S., 1962. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Paris.
- RECHINGER K. H., 1964. Flora of Lowland Iraq. Cramer in Weinheim.
- RENFREW, J. M. 1973. Palaeoethnobotany. The prehistoric food plants of the Near East and Europe. Methuen & Co., London. p. 153, 197, 199–200.
- RIVERA D., ALCARAZ F., INOCENCIO C., OBÓN C. & CARREÑO E., 1999. Taxonomic study of cultivated *Capparis* sect. *Capparis* in the western Mediterranean. *Taxonomy of Cultivated Plants*. Royal Botanic Gardens Kew, pp 451- 455.
- RIVERA D., INOCENCIO C., OBÓN C., CARREÑO E., REALES A. & ALCARAZ F., 2002. Archaeobotany of capers (*Capparis*) (Capparaceae). *Vegetation History and Archaeobotany*, 11 : 295–313.
- RIVERA D., INOCENCIO C., OBÓN C. & ALCARAZ F., 2003. Review of food and medicinal uses of *Capparis* L. subgenus *Capparis* (Capparidaceae). *Economic Botany*, 57 : 515–534.
- SHANNON C. E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27 : 379- 423, 623-656.
- SIRAGUSA M. & CARIMI F., 2009. Development of specific primers for cpSSR analysis in caper, olive and grapevine using consensus chloroplast primer pairs. *Scientia Horticulturae* 120: 14–21

- SIRAGUSA M., DI PASQUALE F., ABBATE L., MARTORANA L. & TUSA N., 2008. The Genetic Variability of Sicilian Lemon Germplasm Revealed by Molecular Marker Fingerprints. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133 (2) : 242–248. 2008.
- SOZZI G. O., 2001. Caper Bush: Botany and Horticulture. *Horticultural Reviews*, Vol. 27.
- TACKHOLM V., 1974. Student's flora of Egypt, ed. 2. Publ. Cairo Univ., Beirut.
- TAN K., 2002 in STRID A. e TAN K., *Flora Hellenica*. Vol. 2 (Nymphaeaceae-Platanaceae). ARG Gantner Verlag.
- TAUTZ D. & RENZ M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12 : 4127-4128.
- TLILI N., ELFALLEH W., SAADAOU E., KHALDI A., TRIKI S. & NASRI N., 2010. The caper (*Capparis* L. ): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia*, Vol. 82, Issue 2 : 93-101
- VALDES, B., REJDALI, M., ACHHAL EL KADMIRI, A., JURY S.L. & MONTSERRAT J.M. (Eds) *Catalogue des plantes vasculaires du nord du Maroc, incluant des clés d'identification*, Vol. 1, Madrid : CSIC.
- VAN HEEZIK Y. & SEDDON P. J. 1999. Seasonal changes in habitat use by Houbara Bustards *Chlamydotis [undulata] macqueenii* in northern Saudi Arabia. *Ibis* 141: 208–215
- VAN ZEIST, W. & BAKKER- HEERES, J.A.H., 1985. Archaeobotanical studies in the Levant 4. Bronze Age sits on the North Syrian Euphrates. *Palaeohistoria* 27 : 247-316.
- WOLFE K. H., SHARP P. M. & LI W.H., 1989. Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution* Volume 29, Number 3, 208-211
- WOOD J. R. I., 1997. *Handbook of the Yemen Flora*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A. & LABUDA D. (1994). Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 : 176-183.
- ZOHARY M., 1960. The species of *Capparis* in the Mediterranean and the near eastern countries. *Bulletin of the Research Council of Israel* 8D: 49–64.
- ZOHARY M., 1966. *Flora Palestina*, 1, Equisetaceae- Moringaceae. Jerusalem.