

| | | | | |
|-------------------------|----------------------------|----------------|---------|------|
| Ann. Mus. civ. Rovereto | Sez.: Arch., St., Sc. nat. | Vol. 28 (2012) | 135-159 | 2013 |
|-------------------------|----------------------------|----------------|---------|------|

SILVIA CREMA & GIOVANNI CRISTOFOLINI

FILOGENESI DI *PRIMULA* SUBSECT. *EUARICULA* UN ESEMPIO DI ORIGINE ED EVOLUZIONE DELL'ENDEMISMO ALPINO

Abstract - SILVIA CREMA & GIOVANNI CRISTOFOLINI - Phylogeny of *Primula* Subsect. *Euaricula* - A case study on origin and evolution of alpine endemism.

We performed a phylogenetic study employing AFLP nuclear markers on *Primula* Sect. *Auricula* Subsect. *Euaricula*, a set of species mainly distributed on the Italian Alps and Pre-Alps, with a very high rate of endemism. We analysed 261 samples collected in the wild from 33 populations. The phylogenetic analysis provided evidence that: (a) Subsect. *Euaricula* constitutes a monophylum, diversified during the Pleistocene; (b) a polytomy is at the base of the cladogram, suggesting an event of simultaneous multiple speciation; (c) *P. palinuri*, the only species of Mediterranean coastal habitats, diverged very early from the rest of the subsection, and is not related to any other extant species; (d) *P. auricula* and *P. balbisii* are merged in a single, well supported clade, that is sister to the rest of the subsection; (e) the calcifuge species form a clade of recent origin; (f) among them, a well supported clade includes *P. pedemontana*, *P. cottia* and *P. apennina*; *P. cottia* is not related to *P. villosa*, with which it has been often confused; (g) *P. hirsuta* forms a clade with the calcicole endemics ssp. *valcuvianensis* e *P. grignensis*, which, in their turn, form a separate sub-clade; (h) *P. albenensis* and *P. recubariensis* form a well supported clade. We conclude that *P. palinuri* is the only endemic species with relictual character, while the pattern of diversity of the Alpine and North-Appenninic endemics is better explained by assuming that climatic and vegetational changes during Pleistocene and Holocene caused range expansion at low altitudes during the cold periods, and range contraction with local extinction and consequent genetic isolation during the warm periods. Lastly, in accordance with the results obtained, the new name *Primula valcuvianensis* stat. nov. is published.

Key words: AFLP - Alps - Endemism - Phylogeny - *Primula*.

Riassunto - SILVIA CREMA & GIOVANNI CRISTOFOLINI.- Filogenesi di *Primula* Subsect. *Euaricula*. Un esempio di origine ed evoluzione dell'endemismo alpino.

Abbiamo compiuto uno studio filogenetico con l'impiego di marcatori nucleari AFLP su *Primula* sect. *Auricula* subsect. *Euaricula*, un gruppo distribuito prevalentemente sulle Alpi e

Prealpi Italiane, in cui si manifesta un tasso altissimo di endemismo. Abbiamo esaminato 261 campioni raccolti da 33 popolazioni naturali. L'analisi filogenetica ha dimostrato che: (a) si tratta di un gruppo monofiletico, diversificatosi durante il Pleistocene; (b) alla base del cladogramma si osserva una politomia, che pare indicare un episodio di cladogenesi multipla simultanea; (c) *P. palinuri*, unica specie mediterranea e costiera, si è separata molto precocemente, e non manifesta affinità con alcuna specie attuale; (d) *P. auricula* forma un unico clade con *P. balbisii*, da cui non è distinguibile, ed è *sister* rispetto al resto della sottosezione; (e) le specie acidofile formano un clade di recente genesi; (f) fra le acidofile, un clade ben supportato include *P. pedemontana*, *P. cottia* e *P. apennina*, mentre *P. cottia* non ha affinità con *P. villosa*, con cui è stata spesso confusa; (g) *P. hirsuta* forma un clade con le calcifile ssp. *valcuvianensis* e *P. grignensis*, che risultano tuttavia separate da essa; (h) *P. albenensis* e *P. recubariensis* formano un clade ben supportato. Questi risultati suggeriscono che la sola *P. palinuri* mostra i caratteri dell'endemismo relitto, mentre la distribuzione della diversità delle endemiche alpine e nord-appenniniche meglio si spiega con un modello evolutivo che fa riferimento alle oscillazioni climatiche e vegetazionali del Pleistocene e dell'Olocene, che hanno determinato fasi di espansione degli areali alle basse quote durante i periodi freddi, ed isolamento geografico e genetico nelle zone cacuminali nei periodi caldi. Infine, in base ai dati ottenuti è pubblicato il binomio *Primula valcuvianensis* stat. nov.

Parole chiave: AFLP - Alpi - Endemismo - Filogenesi - *Primula*.

INTRODUZIONE

Il genere *Primula* L. comprende oltre 400 specie di piante erbacee perenni, diffuse soprattutto nelle aree montane del regno floristico paleartico. Il principale centro di diversità è la regione Sino-Himalayana, dove si trovano circa 225 specie, pari ad oltre il 50% del totale; considerando anche le regioni finitime dell'Asia Centrale, raggiungiamo il 78% delle specie. L'Europa, con 34 specie riconosciute, rappresenta un centro di diversità secondario, probabilmente diversificato durante il Pleistocene (RICHARDS, 2003).

Nella complessa sistematica del genere, nella quale non ci addentriamo in questa sede, si distingue in particolare la Sez. *Auricula* Duby, presente con una notevole ricchezza di specie su tutto il sistema Alpino, con qualche appendice nella penisola italiana. Caratteristiche peculiari di questa sezione sono la prefogliazione involuta (le foglie sono avvolte, nel germoglio, verso la superficie superiore), la superficie fogliare liscia (non rugosa come in altre sezioni), le brattee fiorali più brevi dei peduncoli, i denti del calice ottusi.

Recenti studi fanno supporre che le primule della Sez. *Auricula* siano derivate da una specie o da un complesso di specie ancestrale, diffusa lungo tutto l'arco Alpino e l'Appennino, la cui distribuzione si sarebbe frammentata durante le oscillazioni climatiche del Quaternario (RAVAZZI, 1997; ZHANG & KADEREIT, 2004; KADEREIT *et al.*, 2004). Un'analisi molecolare basata sulla sequenza dell'*internal transcribed spacer* (ITS) e del DNA ribosomale 5.8S ha suggerito che la Sez. *Au-*

ricula si sia originata all'incirca 3,6 Mya ⁽¹⁾, ossia nel Tardo Pliocene; la sezione avrebbe poi iniziato a diversificarsi all'incirca 2.4 Mya, ossia al limite Plio-Pleistocene (ZHANG *et al.*, 2004). Si ritiene che le oscillazioni climatiche particolarmente accentuate durante il medio-tardo Pleistocene (<1.5 Mya) abbiano avuto un impatto rilevante, comportando riduzione degli habitat e dell'areale delle specie. Una conseguenza di tali oscillazioni è stata, verosimilmente, l'aumento del tasso di estinzione in quelle aree, soprattutto delle Alpi Occidentali, maggiormente ricoperte dai ghiacci. Attualmente, la Sez. *Auricula* è endemica dei sistemi montuosi dell'Europa meridionale, dai Monti Cantabrigi ai Pirenei, Alpi, Appennini, Tatra, Carpazi e Balcani. La maggiore diversità specifica si trova sulle Alpi, con 21 specie di cui 12 endemiche locali o regionali (AESCHIMANN *et al.*, 2004).

ZHANG & KADEREIT (2004) hanno dimostrato, impiegando marcatori molecolari, che la Sezione *Auricula* si divide in due gruppi monofiletici («cladi»), l'uno a centro di gravità Occidentale e l'altro Orientale. Essi hanno riconosciuto quindi due sottosezioni, *Euauricula* Pax e *Cyanopsis* (Schott) Pax (ZHANG & KADEREIT, 2005). Abbiamo dedicato questa ricerca alla prima delle due, perché si tratta di un gruppo di distribuzione eminentemente alpica, costituito quasi esclusivamente da specie presenti in Italia, con un tasso di endemismo altissimo, e quindi del massimo interesse sia floristico che conservazionistico: dei 16 taxa specifici o infraspecifici qui riconosciuti (Tab. 1), 6 hanno una distribuzione relativamente ampia, o disgiunta fra diversi sistemi montuosi dell'Europa meridionale, mentre 9 sono endemici di settori più o meno ristretti delle Alpi; peculiarissimo è poi il caso dell'unica specie non alpina, *P. palinuri*, endemismo puntiforme della costa cilentina e calabra.

La maggioranza delle specie ha esigenze edafiche molto ristrette: 7 specie sono calcifile obbligate, mentre le rimanenti sono acidofile o tollerano substrati diversi; un caso particolare è quello di *P. hirsuta*, dove la sottospecie nominale è acidofila, ma la sottospecie strettamente endemica *P. hirsuta* subsp. *valcuviensis* è basifila (Tab. 1). La maggior parte delle specie sono sassicole, rupicole o casmofite, solo poche di esse partecipano a cenosi erbacee, su terreni più o meno maturi (ZHANG *et al.*, 2004).

Ecologia riproduttiva

Tutte le Primule della Sez. *Auricula* si riproducono in modo sessuato. I fiori sono eterostili, ossia all'interno della specie coesistono due tipi di fiore: longistilo, con lo stilo lungo, lo stigma collocato in corrispondenza dell'apertura del

⁽¹⁾ Mya: milioni di anni prima del presente.

| 1 | 2 | 3 |
|---|-----------|---|
| Specie | Substrato | Distribuzione |
| <i>P. albenensis</i> Banfi & Ferlinghetti | Ca | Endemismo puntiforme - Prealpi Bergamasche |
| <i>P. allionii</i> Lois. | Ca | Endemica - Alpi Cozie e Marittime |
| <i>P. apennina</i> Widmer | Si | Endemismo puntiforme - Appennino Tosco-Emiliano |
| <i>P. auricula</i> L. [incl. " <i>P. balbisii</i> Lehm."] | Ca | Orofita Sud-Europea |
| <i>P. carniolica</i> Jacq. | Ca | Orofita E-Alpica, Illirica e Dinarica |
| <i>P. cotta</i> Widmer | Si | Endemismo puntiforme - Alpi Cozie |
| <i>P. daonensis</i> (Leyb.) Leyb. | Si(Ca) | Endemica - Alpi e Prealpi Centrali |
| <i>P. grignensis</i> Moser | Ca | Endemismo puntiforme - Grigna |
| <i>P. hirsuta</i> All. | Si | Areale disgiunto: Alpi Centrali e Occidentali e Pirenei |
| <i>P. hirsuta</i> All. subsp. <i>valcuvianensis</i> S. Jess. & L. Lehm. | Ca | Endemismo puntiforme - Prealpi Varesine |
| <i>P. latifolia</i> Lapeyr. | Si | Areale disgiunto: Alpi Centrali e Occidentali e Pirenei orientali |
| <i>P. marginata</i> Curtis | Ca | Endemica - Alpi Occidentali, da Marittime a Pennine |
| <i>P. palinuri</i> Petagna | Si | Endemismo puntiforme - Costa del Cilento |
| <i>P. pedemontana</i> Thomas ex Gaudin | Si | Alpi Occidentali, da Marittime a Pennine; una località segnalata sui Monti Cantabrici |
| <i>P. recubariensis</i> Prosser & Scortegagna | Ca | Endemismo puntiforme - Piccole Dolomiti |
| <i>P. villosa</i> Wulfen | Si | Areale disgiunto: Alpi da Cozie a Pennine, e Alpi Orientali e Karawanken |

Tab. I - Elenco delle specie delle Sottosez. *Euauricula*.

Colonna 1 - identificazione del taxon.

Colonna 2 - preferenza di substrato: Ca = specie preferenzialmente calcifila; Si = specie preferenzialmente silicicola.

Colonna 3 - distribuzione geografica; dati originali, e desunti da AESCHIMAN *et al.*, 2004; CONTI *et al.*, 2005; KRESS, 1997; RICHARDS, 2003; ZHANG & KADEREIT, 2004.

tubo corollino, ed antere collocate quasi alla base del tubo stesso, e brevistilo, con stilo breve, stigma racchiuso nella parte bassa del tubo corollino, ed antere collocate presso l'apertura del medesimo. La fecondazione può avvenire solo fra fiori di tipo diverso. L'impollinazione è mediata esclusivamente da insetti. Non esistono molti studi sull'ecologia dell'impollinazione; una delle poche specie su cui si hanno informazioni precise è *Primula apennina*, specie nella quale FISOGNI *et al.* (2011) hanno dimostrato che l'impollinazione a breve distanza può essere mediata dallo Stafilinide *Eusphalerum signatum* (MARKEL 1857), ma l'impollina-

zione a lungo raggio è garantita da *Macroglossum stellatarum* (Linnaeus 1758), grosso Sfingide di abitudini diurne, in grado di superare velocemente distanze di chilometri e dislivelli di molte centinaia di metri.

Ibridi fra specie diverse sono stati segnalati occasionalmente, ma raramente sono fertili (RICHARD, 1993). Sul Monte Fumante (Gruppo del Carega), *P. recubariensis* cresce simpatica con *P. auricula*, e sono stati osservati occasionali ibridi con morfologia intermedia (PROSSER & SCORTEGAGNA, 1998, e oss. pers.). L'assenza però di uno «sciame ibrido» e di manifestazioni di introgressione indica che si tratta di individui sterili. In generale, dove due specie della sezione crescono simpatriche, esse occupano nicchie ecologiche diverse e fortemente specializzate, come nel caso citato qui sopra, o nel caso di *P. albenensis*, *P. auricula* e *P. glaucescens* sul Monte Alben (BOGLIONI & FALGHERI, 1996), per cui la fitness dell'eventuale ibrido risulta ridotta.

Recenti scoperte floristiche

La ricerca sistematica e filogenetica ha compiuto, negli ultimi decenni, progressi importantissimi, soprattutto grazie all'introduzione di nozioni e di tecniche mutuata dalla biologia molecolare. L'analisi di segmenti di DNA nucleare e plastidiale, con metodi e tecniche in veloce evoluzione, ha costituito una sorgente di informazione prima impensabile per formulare ipotesi filogenetiche non puramente congetturali ma fondate su dati sperimentali. Tutte le principali riviste di sistematica biologica ospitano, da alcuni decenni a questa parte, numerosi contributi di sistematica molecolare, che spaziano dai rapporti fra specie ad ambiziose ricostruzioni di un'ipotetica filogenesi globale. Questo progresso metodologico, con la conseguente produzione di ricostruzioni filogenetiche, sarebbe però privo di basi se non fosse accompagnato da un parallelo sviluppo delle conoscenze floristiche e faunistiche, che costituiscono la base fattuale su cui si basano tutte le analisi filogenetiche. La conoscenza reale e concreta della biodiversità è stata e resta il solo fondamento di ogni ricostruzione sistematica e filogenetica. Le conoscenze floristiche e faunistiche hanno conosciuto, in particolare negli ultimi decenni, un costante sviluppo, e questo vale anche nel caso delle Primule della Sez. *Auricula*, per le quali l'esplorazione delle Alpi e delle Prealpi ha portato alla scoperta, in pochi anni, di numerose entità nuove, quali *Primula albenensis* BANFI & FERLINGHETTI (1993), *Primula recubariensis* PROSSER & SCORTEGAGNA (1998), *P. grignensis* MOSER (1998), *P. hirsuta* All. subsp. *valcuvianensis* JESEN & LEHMANN (2005). Si tratta di entità strettamente endemiche, i cui caratteri e la cui distribuzione sollevano interessanti problemi sistematici e filogenetici.

Scopo del lavoro

Questo lavoro si propone di dare un contributo alla comprensione dell'origine ed evoluzione delle Primule della Sect. *Auricula* Subsect. *Euauricula*, con particolare attenzione al fenomeno dell'endemismo e della sua genesi.

Una filogenesi della Sezione è stata fatta in passato utilizzando marcatori ITS (ZHANG & KADEREIT, 2004), tuttavia non poche relazioni interspecifiche sono rimaste irrisolte. Nel presente lavoro abbiamo impiegato marcatori AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*), la cui risoluzione si è spesso rivelata maggiore di quella raggiunta da altri marcatori, soprattutto a livello di specie strettamente correlate (PLEINES & BLATTNER, 2008; SCHORR *et al.*, 2012). Inoltre, abbiamo incluso nell'analisi tutte le endemiche alpine della sottosezione, alcune delle quali non erano state considerate nei lavori precedenti. Il lavoro si propone quindi di contribuire alla conoscenza della diversità floristica delle Alpi, anche nella prospettiva della sua conservazione.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'analisi ha coinvolto 16 taxa della Sez. *Auricula* Sottosez. *Euauricula* e 3 della Sottosez. *Cyanopsis* (Tab. I), queste ultime utilizzate come gruppo di riferimento esterno (*outgroup*) nell'analisi filogenetica. È stato campionato anche un ibrido *P. recubariensis* x *balbisii* (non incluso nei cladogrammi). Le specie a più ampia diffusione sono state rappresentate da più popolazioni, in modo da ottenere un campione rappresentativo della variabilità nell'intero areale. Abbiamo utilizzato esclusivamente materiale fresco raccolto in natura. Da ogni popolazione abbiamo campionato da un minimo di 2 o 3 (in soli due casi, di popolazioni molto ridotte) fino a 9 piante (nella grande maggioranza dei casi); per gli *outgroup* in numero è stato di 5 individui per popolazione. Complessivamente abbiamo campionato 33 popolazioni più un ibrido, per un totale di 261 individui (Tab. II).

Nella raccolta si è avuto cura che le piante campionate distassero l'una dall'altra almeno alcuni decimetri, o fossero separate da roccia affiorante, per garantire che non fossero generate per via vegetativa da uno stesso individuo. Da ogni pianta abbiamo prelevato una foglia della rosetta basale, che è stata riposta immediatamente in una fiala con gel di silice, è stata trasportata in laboratorio e trattata quanto prima per l'estrazione del DNA.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|-------|----------|---------|
| Specie | Località | Racc. | N° camp. | Codice |
| Subject. <i>Euauricula</i> Pax | | | | |
| <i>P. albenensis</i> Banfi & Ferlinghetti | Val d'Ancogno (Lombardia) | B | 9 | ALB |
| <i>P. allionii</i> Lois. | Gorge de la Reina, Entracque (Piemonte) | B | 9 | ALL |
| <i>P. apennina</i> Widmer | Monte Buffanaro (Emilia) | B | 9 | APP |
| <i>P. auricula</i> L. | Schmirntal (Tirol, Austria) | M | 9 | AUR |
| <i>P. auricula</i> L. | Geißspitze (Vorarlberg, Austria) | M | 2 | AURb |
| <i>P. auricula</i> L. [« <i>P. balbisii</i> Lehm.»] | M.Fumante (Gruppo Carega, Trentino) | B | 9 | BALa |
| <i>P. auricula</i> L. [« <i>P. balbisii</i> Lehm.»] | Corno alle Scale (Emilia) | B | 9 | BALb |
| <i>P. auricula</i> L. [« <i>P. balbisii</i> Lehm.»] | Kamniške/Savinjske Alpe (Slovenia) | M | 9 | BALc |
| <i>P. carniolica</i> Jacq. | Notranjska pri Borovnici (Slovenia) | M | 9 | CAR |
| <i>P. cottia</i> Widmer | Lago Lausun (Piemonte) | B | 3 | COT |
| <i>P. cottia</i> Widmer | Prali Ghigo, Val Germanasca (Piemonte) | B | 9 | COTb |
| <i>P. daonensis</i> (Leyb.) Leyb. | Passo Vivione (Lombardia) | M | 9 | DAOa |
| <i>P. daonensis</i> (Leyb.) Leyb. | Passo Stelvio (Alto Adige) | M | 9 | DAOb |
| <i>P. grignensis</i> Moser | Grigna (Lombardia) | M | 5 | HIRg |
| <i>P. hirsuta</i> All. | Parc Nat. des Ecrins (Rhone-Alpes, Francia) | M | 9 | HIRa |
| <i>P. hirsuta</i> All. | Val Solda (Alto Adige) | M | 9 | HIRb |
| <i>P. hirsuta</i> All. | Gauertal (Vorarlberg, Austria) | M | 9 | HIRc |
| <i>P. hirsuta</i> All. subsp. <i>valcuvia-</i> <i>nensis</i> S. Jess. & L.Lehm. | Valcuvia (Lombardia) | M | 5 | HIRv |
| <i>P. latifolia</i> Lapeyr. | Colle Sommeiller (Piemonte) | M | 9 | LATa |
| <i>P. latifolia</i> Lapeyr. | Vallon de Fontanalbe (Alpes Maritimes, Francia) | M | 9 | LATb |
| <i>P. latifolia</i> Lapeyr. | Passo Albula (Grigioni, Svizzera) | M | 9 | LATc |
| <i>P. marginata</i> Curtis | Les Cadières (Cevennes, Francia) | M | 9 | MARa |
| <i>P. marginata</i> Curtis | Ponte di Nava (Piemonte) | M | 9 | MARb |
| <i>P. marginata</i> Curtis | Gorge de la Reina, Entracque (Piemonte) | B | 5 | MARc |
| <i>P. palinuri</i> Petagna | Porto di Palinuro (Campania) | B | 9 | PALa |
| <i>P. palinuri</i> Petagna | Cala di Pozzallo (Campania) | B | 9 | PALb |
| <i>P. pedemontana</i> Thomas ex Gaudin | Balme (Piemonte) | B | 9 | PED |
| <i>P. recubariensis</i> Prosser & Scortegagna | M. Fumante (Gruppo Carega, Trentino) | B | 9 | REC |
| <i>P. recubariensis</i> x <i>auricula</i> | M.Fumante (Gruppo Carega, Trentino) | B | 1 | RECxBAL |
| <i>P. villosa</i> Wulfen | Kamniške/Savinjske Alpe (Slovenia) | M | 9 | VILa |
| <i>P. villosa</i> Wulfen | Nockberge (Kärnten, Austria) | M | 9 | VILb |

continua

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-------------------------------------|----------------|--------|-----|
| Specie | Località | Racc. N° camp. | Codice | |
| Subsect. <i>Cyanopsis</i> (Schott) Pax | | | | |
| <i>P. glaucescens</i> Moretti | Val d'Ancogno (Lombardia) | B | 5 | GLA |
| <i>P. spectabilis</i> Tratt. | M.Fumante (Gruppo Carega, Trentino) | B | 5 | SPE |
| <i>P. wulfeniana</i> Schott | Kamniške/Savinjske Alpe (Slovenia) | M | 5 | WUL |

Tab. II - Elenco delle popolazioni studiate.

Colonna 1 - Attribuzione specifica del campione. Le tre specie della Subsect. *Cyanopsis* sono state usate come specie di riferimento esterno ("outgroup").

Colonna 2 - Località di raccolta. I dati completi (data di raccolta e nomi dei raccoglitori) sono disponibili su richiesta.

Colonna 3 - Istituzione dove sono conservati i campioni di riferimento: B= Erbario, Sistema Museale di Ateneo, Università di Bologna; M=Institut für Spezielle Botanik, Universität Mainz.

Colonna 4 - Numero di individui campionati.

Colonna 5 - Codice di identificazione della popolazione.

Marcatore molecolari

Il DNA è stato estratto da 10-15 mg di materiale fogliare, disidratato con gel di silice e successivamente in liofilizzatore, su cui abbiamo applicato la tecnica degli AFLP (Vos *et al.*, 1995). Gli AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*) sono marcatori molecolari dominanti e multilocus, ampiamente utilizzati in studi di diversità genetica inter ed intra specifica e per identificare ibridi (BONIN *et al.*, 2007). Numerosi sono gli studi recenti in cui gli AFLP sono stati utilizzati per ricostruire relazioni filogenetiche tra specie strettamente correlate (ad es. KELSO *et al.*, 2009; PLEINES & BLATTNER, 2008).

La tecnica AFLP consiste nell'utilizzo di oligonucleotidi (*adapters*) contenenti sequenze specifiche per enzimi che determinano la restrizione del DNA e la produzione di frammenti che poi vengono amplificati in reazioni di PCR (*polymerase chain reactions*). I frammenti di restrizione amplificati vengono marcati. Si procede quindi all'analisi delle bande ottenute tramite sequenziatore automatico, ovvero dei siti di restrizione che possono presentare lunghezze variabili nelle diverse specie. I loci AFLP vengono trattati come due alleli identificati dalla presenza o dall'assenza della banda. Per ridurre al minimo gli errori di tipizzazione genetica, che possono incorrere in qualunque fase dell'analisi di laboratorio, viene effettuato un adeguato numero di repliche. In questo lavoro le repliche sono state fatte su 19 individui. Errori dovuti alla soggettività della determinazione della presenza o dell'assenza delle bande sono stati ridotti seguendo il protocollo di WHITLOCK *et al.* (2008).

La tecnica AFLP permette di amplificare un alto numero di frammenti di restrizione, assomigliando in questo alla tecnica RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), con la differenza sostanziale che essa rivela la presenza o assenza di frammenti di restrizione piuttosto che la differenza di lunghezza dei frammenti tipica degli RFLP. La tecnica AFLP è più affidabile degli RFLP e dei RAPD (*Random Amplification of Polimorphic DNA*) perchè utilizza condizioni di reazione più stringenti per il legame dei primer (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999). La tecnica AFLP non richiede che si conoscano le sequenze su cui si effettua l'analisi ed utilizza un set di primer limitati. Tuttavia gli AFLP sono generalmente trattati come marcatori dominanti; è quindi difficile distinguere tra individui omozigoti ed eterozigoti per la presenza dell'allele (BONIN *et al.*, 2007). Una caratteristica positiva degli AFLP è che essi richiedono l'uso di una piccolissima quantità di DNA, e questo è importante dal punto di vista conservazionistico, perchè il campionamento in natura ha così un impatto minimo sulla popolazione studiata, anche quando questa consista di un piccolo numero di esemplari.

Elaborazione dei dati

I frammenti di DNA ottenuti sono stati registrati come presenti (1) o assenti (2) in una matrice di x popolazioni per y frammenti di DNA, sulla quale sono stati calcolati il numero e la percentuale di *loci* polimorfici (programma *Popgene 3.2*, YEH *et al.* 1997) e la distanza genetica di NEI & LI (1979). Le distanze di Nei e Li sono poi state utilizzate per costruire cladogrammi attraverso analisi di *Neighbor Joining* (NJ: SAITOU & NEI, 1987) e di Parsimonia; la robustezza dei cladi è stata controllata con 100 repliche di *bootstrap* (BS; programma *PAUP v4.0b10*, SWOFFORD, 2002). Per chiarire le relazioni interspecifiche sono state estratte le coordinate principali (PCOs) dalla matrice di distanze di Jaccard tra i fenotipi AFLP; queste sono state elaborate graficamente col programma *PAST 1.89* (HAMMER *et al.*, 2001). La struttura filogeografica è stata indagata attraverso un metodo di raggruppamento implementato dal programma *BAPS 5.2* (CORANDER & MARTINEN, 2005; CORANDER *et al.*, 2008) producendo una *admixture analysis*, che rappresenta il grado di mescolanza genetica tra le popolazioni.

Infine, abbiamo impiegato la tecnica recentemente sviluppata da KROPF *et al.* (2009) per calcolare un orologio molecolare basato sul tasso di divergenza genetica interspecifica (NEI, 1972) dei marcatori AFLP. Allo scopo, abbiamo applicato il software *Popgene v 3.2* (YEH *et al.*, 1997) al dendrogramma derivato dai valori di divergenza genetica interspecifica dei marcatori AFLP da noi ottenuti, usando l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, SOKAL & MICHENER, 1958). Al dendrogramma abbiamo applicato i tassi di diversificazione genetica ottenuti da KROPF ($DN72 = 0.037$ ogni 10,000 anni) su

un complesso di specie delle Alpi Sud-Occidentali evolute in tempi e condizioni simili alle Primule della Sez. *Auricula*.

RISULTATI

L'analisi AFLP è stata portata a termine con successo su 252 individui della Sottosez. *Euauricula* e della Sottosez. *Cyanopsis*; solo 9 campioni hanno dovuto essere eliminati per la qualità scadente dell'estratto. Le tre coppie di primers utilizzati hanno prodotto 649 frammenti polimorfici di cui solo il 3,7% presenti in più di 200 individui e l'11,2% presenti in più di 100 individui. È stata creata una matrice di presenza (1) e assenza (0) dei frammenti individuati, sulla base della quale sono state condotte le successive elaborazioni.

L'analisi di Parsimonia (Fig. 1) in cui *P. glaucescens* (Sottosez. *Cyanopsis*), è stata utilizzata come outgroup, ha confermato l'origine monofiletica delle specie appartenenti alla Sottosez. *Euauricula* con 100% di supporto bootstrap (BS). L'analisi di Neighbor Joining ha confermato le relazioni emerse dalla Parsimonia, e non viene qui mostrata.

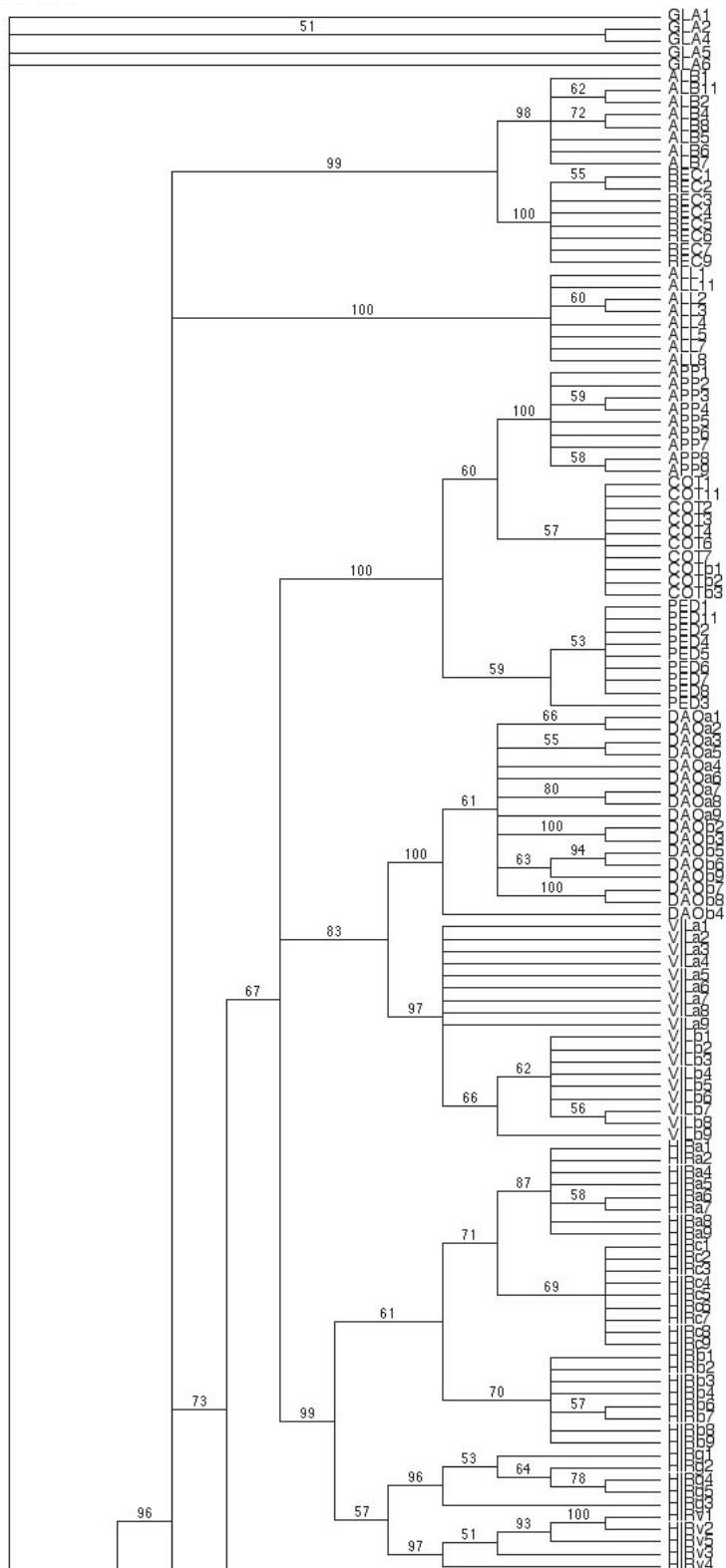
All'interno della sottosezione gli individui di tutte le specie formano cladi fortemente supportati (si indicano qui di seguito, fra parentesi, i valori di Bootstrap riferiti rispettivamente alle analisi di Neighbor Joining e di Parsimonia): *P. albenensis* (100-98), *P. recubariensis* (100-100), *P. allionii* (100-100), *P. apennina* (100-100), *P. cottia* (91-57), *P. pedemontana* (93-59), *P. daonensis* (100-61), *P. villosa* (100-97), *P. hirsuta s.l.* (98-99), *P. auricula* incl. *P. balbisii* (100-100), *P. carniolica* (100-100), *P. latifolia* (100-100), *P. marginata* (100-100), *P. palinuri* (100-100).

Nel clade di *P. auricula* incl. *P. balbisii* le singole popolazioni risultano fortemente distinte e supportate, ma non emergono gruppi distinti tra le due putative specie. Il clade di *P. hirsuta s.l.* è diviso a sua volta in due cladi, l'uno inclusivo delle tre popolazioni di *P. hirsuta s.s.* (53-61) e l'altro inclusivo di *P. h. subsp. valcuvianensis* e *P. grignensis* (52-57); all'interno di quest'ultimo, ciascuno dei due taxa è fortemente supportato.

Il cladogramma evidenzia anche dei cladi di ordine superiore fortemente supportati, accanto ad altri in cui le relazioni reciproche tra le specie sono state risolte solo in parte:

- 1) Un clade supportato da un valore di BS di 91% (Neighbor Joining) e di 67% (Parsimonia) include le specie acidofile *P. apennina*, *P. pedemontana*, *P. cot-*

Fig. 1 - Cladogramma di tutti gli individui studiati costruito secondo l'Analisi di Parsimonia. Sigle delle popolazioni come in Tab. II.



tia, *P. hirsuta*, *P. daonensis*, *P. villosa*. All'interno di questo clade se ne individua un secondo, supportato dal 100% di BS, contenente *P. apennina*, *P. cottia* e *P. pedemontana*.

- 2) Un clade supportato dal 100% di BS (Neighbor Joining) e 99% (Parsimonia) include *P. recubariensis* e *P. albenensis*.
- 4) Un clade associa *P. daonensis* e *P. villosa* (84-83).

Al livello superiore, sia l'analisi di Parsimonia che di Neighbor Joining conducono ad un'ampia politomia, nella quale non si può riconoscere un pattern di nodi successivi.

L'analisi PCO (Fig. 2) ha individuato quattro gruppi di specie: uno include le acidofile *P. apennina*, *P. pedemontana*, *P. cottia*, *P. hirsuta*, *P. daonensis*, *P. villosa*; uno contiene le popolazioni di *P. auricola* incl. *P. balbisii*; un terzo, separato, è costituito soltanto da *P. palinuri*; un quarto comprende tutte le specie rimanenti.

L'analisi Bayesiana (Fig. 3) svolta su tutti gli individui ha confermato i risultati ottenuti con le analisi di Parsimonia, NJ e PCO, individuando gruppi genetici distinti per ciascuna specie; soltanto tre gruppi di specie, costituiti rispettiva-

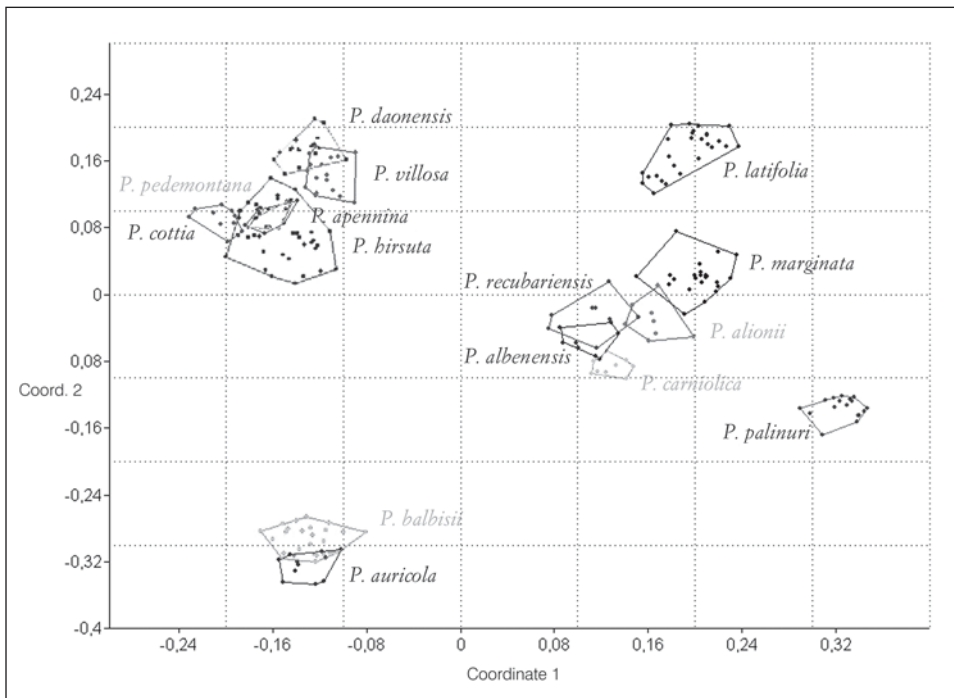


Fig. 2 - Analisi delle Coordinate Principali (PCO) di tutti gli individui studiati.

mente da *P. auricula* - *P. balbisii*, *P. albenensis* - *P. recubariensis*, *P. apennina* - *P. cottia* - *P. pedemontana* confluiscono in gruppi genetici comuni.

L'analisi Bayesiana di dettaglio, condotta sul clade delle acidofile (Fig. 4), ha dimostrato la separazione tra le popolazioni di *P. hirsuta* da un lato e quelle di *P. hirsuta ssp valcuvianensis* e *P. grignensis* dall'altro, e indica *P. pedemontana* e *P. cottia* come afferenti ad uno stesso gruppo, mentre ne rimane distinta *P. apennina*.

Infine, dal dendrogramma costruito sulle distanze genetiche di Nei (Fig. 5) è stato calcolato l'orologio molecolare. Da esso si può inferire che la diversificazione all'interno della Sottosezione *Auricula* ha avuto luogo durante gli ultimi $50,000 \pm 40,000$ anni. Malgrado il largo ambito di incertezza, il periodo individuato si colloca all'interno del periodo Würmiano. *P. palinuri* risulta essere la specie che per prima si è diversificata dalle altre (44.000 ± 35.00 anni fa), mentre in tempi successivi, tra i 22.000 e i 16.000 anni fa si sarebbero differenziate le altre specie. In particolare, l'ipotetica successione vede dapprima la separazione di *P. carniolica* e di *P. auricula s.l.*, a cui seguirebbe la separazione di due grandi cladi: da un lato il gruppo di *P. hirsuta* - *villosa* - *daonensis* - *pedemontana* - *cottia* - *apennina*, tutte specie prevalentemente silicicole, dall'altro *P. marginata* - *latifolia* - *allionii* - *recubariensis* - *albenensis*, prevalentemente calcicole. Fra i gruppi di speciazione più recente, si osservano *P. pedemontana* - *cottia* - *apennina* fra le silicicole, e *P. recubariensis* - *albenensis* fra le calcicole.

DISCUSSIONE

Struttura del cladogramma e filogenesi

I marcatori AFLP si sono rivelati un ottimo strumento per chiarire e risolvere le relazioni interne alla Sottosez. *Euauricula*, ed in particolare quelle rimaste irrisolte nelle precedenti indagini. Sia il Neighbor Joining che l'analisi di Parsimonia hanno confermato che la Sottosez. *Euauricula* è un gruppo monofiletico, come dimostrato dal cladogramma radicato mediante l'uso di tre specie della Sottosez. *Cyanopsis* usate come outgroup.

Alla base del cladogramma si osserva una ramificazione multipla simultanea («politomia»), per cui numerosi cladi si dipartono ad uno stesso livello. Tale politomia basale suggerisce che vi sia stato una rapida frammentazione di una specie iniziale ad ampia distribuzione, a seguito del frazionamento del suo areale causato dalle oscillazioni climatiche del Pleistocene. Il processo di speciazione si sarebbe svolto con accumulo di poche mutazioni, a causa della sua rapidità. Non possiamo escludere però che la mancata risoluzione basale del cladogramma sia dovuta invece ad una mancanza di risoluzione filogenetica degli AFLP, perchè con l'aumentare della distanza genetica a volte aumenta il livello di omoplasia tra i frammenti rivelati dagli AFLP (PLEINES & BLATTNER, 2008). A favore della pri-

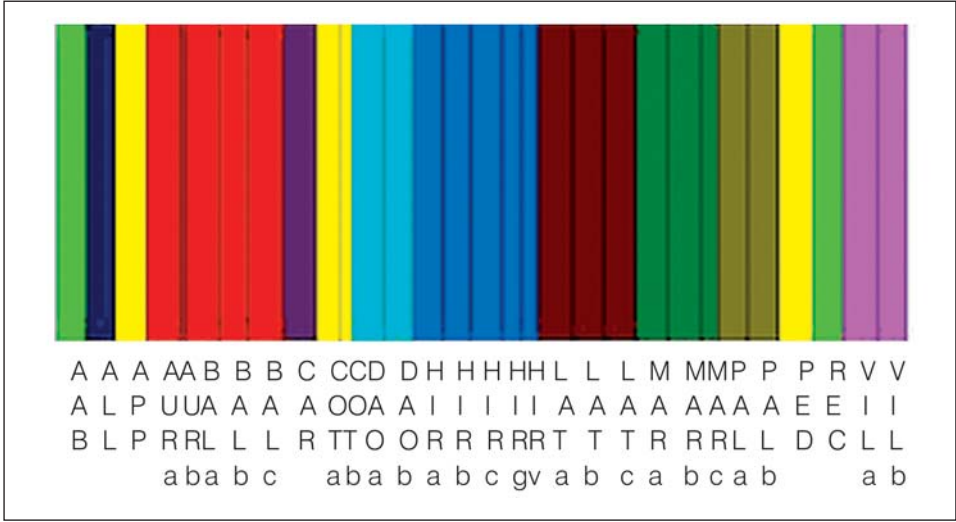


Fig. 3 - Analisi Bayesiana dei taxa studiati. Ad ogni colore corrisponde un gruppo genetico. Sigle delle popolazioni come in Tab. II.

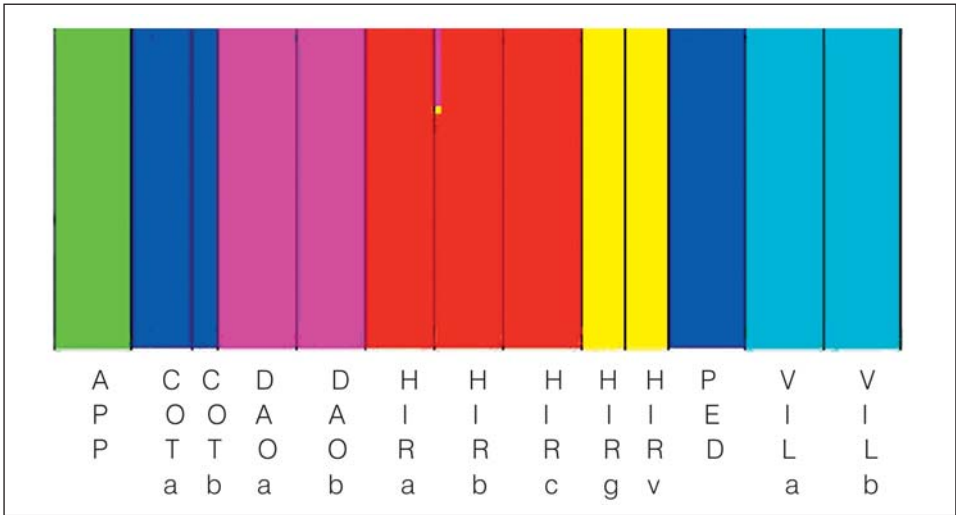


Fig. 4 - Analisi Bayesiana particolareggiata del clade delle specie acidofile. Ad ogni colore corrisponde un gruppo genetico. Sigle delle popolazioni come in Tab. II.

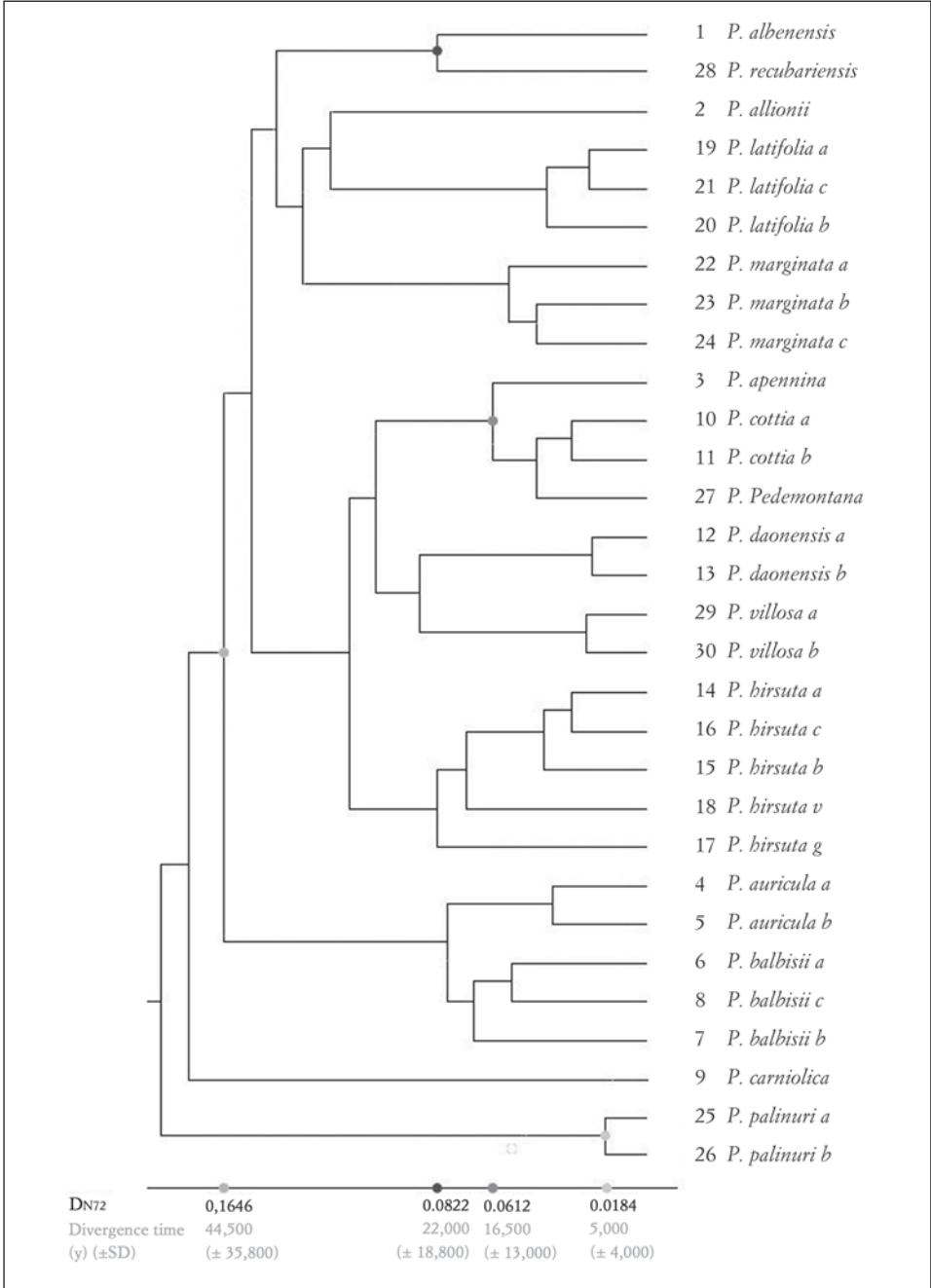


Fig. 5 - Dendrogramma di distanza genetica di Nei costruito con l'algoritmo UPGMA. Le datazioni sono calcolate secondo KROPF *et al.* (2009).

ma ipotesi, osserviamo che gli AFLP si sono dimostrati in grado di differenziare tra *Euauricula* e *Cyanopsis*, indicando che la loro capacità di risoluzione è mantenuta anche a livelli basali. In definitiva, siamo in presenza di una forte indicazione che l'evoluzione di queste specie sia passata attraverso una fase di speciazione multipla simultanea, determinata dalla rapidità delle variazioni climatiche, ma solo l'impiego di ulteriori marcatori molecolari potrà dare una risposta certa.

Il dendrogramma basato sulle distanze di Nei (Fig. 5) suggerisce che il distacco più antico dal ceppo di *Euauricula* sia stato quello di *P. palinuri*, unica specie mediterranea, seguita dall'orientale *P. carniolica*. Si separa poi il ceppo di *P. auricula s.l.*, la specie a distribuzione più ampia, che appare *sister* rispetto a tutto il resto della sottosezione. L'articolazione successiva è fra due grandi cladi; l'uno costituito quasi esclusivamente da specie calcifile (*P. marginata*, *P. latifolia*, *P. allionii*, *P. albenensis*, *P. recubariensis*), l'altro quasi esclusivamente da acidofile (*P. hirsuta s.l.*, *P. villosa*, *P. daonensis*, *P. pedemontana*, *P. cottia*, *P. apennina*). Le specie appartenenti a questo secondo gruppo sono state incluse da alcuni autori nella Sottosez. *Erythrodrosum* Schott (RICHARDS 2003; ZHANG & KADEREIT, 2004) e vengono considerate le specie più recenti (SCHARFETTER, 1953; KRESS, 1963, 1989). Queste specie sono praticamente le uniche della sezione a prediligere suoli acidi e potrebbero essersi originate dalla diversificazione di una specie ancestrale originariamente calcifila, adattatasi ai substrati acidi (ZHANG & KADEREIT, 2004).

I tempi di divergenza calcolati usando l'orologio molecolare AFLP calibrato da KROPF *et al.* (2009) suggeriscono che la principale diversificazione entro la sottosezione – che può aver implicato una cladogenesi multipla – abbia avuto luogo durante il Periodo Würmiano, mentre il gruppo delle silicicole potrebbe essersi differenziato durante l'ultimo massimo glaciale (c. 23,000 - 18,000 anni). Queste datazioni sono coerenti con quelle ottenute da KROPF *et al.* (2009) per tre specie alpine, *Gentiana alpina*, *Kernera saxatilis* e *Silene rupestris*.

Rapporti filogenetici fra le specie

I risultati della ricerca gettano una nuova luce sulla possibile origine di alcune specie e complessi di specie, e suggeriscono alcune considerazioni tassonomiche.

P. auricula s.l. – Questa specie, l'unica ad ampio areale della sezione, non entra né nel clade delle specie calcicole né in quello delle silicicole, bensì risulta *sister* rispetto alla maggior parte della sezione. Le relazioni tra le sue popolazioni rimangono parzialmente irrisolte. La diversità molecolare che si osserva al suo interno suggerisce un'antica differenziazione allopatrica, mentre la diversità morfologica fra le sue popolazioni può rappresentare la risposta a diverse pressioni adattative. Le popolazioni attribuite rispettivamente a *P. auricula* e *P. balbissii* non formano cladi separati, e risultano geneticamente omogenee all'analisi Bayesiana. Si pongono quindi due alternative tassonomiche: o considerare tutto

l'insieme come un unico taxon, o frammentarlo in un numero (ora non definibile) di entità subordinate. Per procedere alla seconda soluzione si richiede però uno studio della diversità molecolare sull'intero areale più esaustivo di quello qui presentato. Allo stato delle conoscenze, mantenere *P. auricula s.l.* come un'unica entità ci pare la soluzione corretta.

P. recubariensis e *P. albenensis* – Queste due specie formano un gruppo monofiletico fortemente supportato, ed è questo un dato inatteso, vista la distanza geografica fra i due endemismi. È degno di nota che le due specie siano riferibili allo stesso gruppo genetico, e che non manifestino un legame stretto con alcuna altra specie. Escludendo per ovvii motivi un'ipotesi di dispersione a grande distanza, la spiegazione più plausibile è che esse siano frutto di un fenomeno di vicarianza geografica derivata da speciazione allopatrica e da estinzione della specie ancestrale nelle zone intermedie, in seguito alle oscillazioni climatiche del Pleistocene.

Il gruppo di P. hirsuta – SCHARFETTER (1953) indicava *P. hirsuta* come specie ancestrale poiché a più ampia diffusione rispetto alle altre; benché questo criterio di analisi sia oggi superato, di fatto l'analisi di Parsimonia mostra che *P. hirsuta* forma un clade supportato dal 99% di BS, *sister* di un clade che contiene tutte le altre specie silicicole del gruppo, dando così un certo supporto alla interpretazione di SCHARFETTER. All'interno del clade di *P. hirsuta s.l.* si rileva un nucleo centrale costituito dalle tre popolazioni di *P. hirsuta s.s.*, mentre le due popolazioni delle endemiche calcicole *P. h.* subsp. *valcuvianensis* e *P. grignensis* si innestano alla base dello stesso clade. Questa osservazione è coerente con i risultati di SCHORR *et al.* (2012) che hanno trovato che, nell'analisi dalle coordinate principali del complesso *P. hirsuta* - *P. daonensis*, questi due endemismi si collocano al margine del cluster di *P. hirsuta*. L'analisi Bayesiana dell'intera sottosezione dimostra che l'intero gruppo di *P. hirsuta* condivide una medesima struttura genetica, ma nell'analisi di dettaglio condotta sul solo gruppo delle acidofile, le due endemiche calcifile si distinguono, associandosi in un gruppo separato. Appare certamente improprio riconoscere il rango specifico a *P. grignensis*, e subordinare la ssp. *valcuvianensis* alla meno affine *P. hirsuta*. Se, come appare dimostrato, il ceppo delle specie acidofile è derivato da progenitori calcicoli, questi due taxa rappresentano un ritorno secondario al substrato calcareo, o attraverso un progenitore comune, come pare suggerire la struttura genetica comune, e per vie indipendenti, come suggeriscono i cladogrammi. Data la dimostrata indipendenza filogenetica, e data la caratterizzazione morfologica oltre che ecologica, ed applicando a questo caso i criteri tassonomici applicati nella generalità di questa sezione, riteniamo appropriato elevare la ssp. *valcuvianensis* al rango di specie, come proposto formalmente al termine di questo lavoro.

P. pedemontana - *P. cottia* - *P. apennina* – Fra le silicicole, queste tre specie formano un clade supportato dal 100% di BS, ed è uno dei gruppi di più recente differenziamento. All'interno di esso, *P. apennina* risulta la prima a separarsi

dalle due endemiche piemontesi. All'analisi Bayesiana della sottosezione le tre specie si associano nello stesso gruppo, mentre all'analisi di dettaglio *P. apennina* si separa dalle altre. Appare evidentemente infondato sul piano biologico, ma anche sul piano fitogeografico, il tentativo di includere *P. apennina* in *P. pedemontana* (ad es. RICHARDS, 2003). Notevole è poi il caso di *P. cottia*, ignorata da flore anche recenti (ad es. AESCHIMAN *et al.*, 2004) o sinonimizzata con *P. villosa* (ad es. RICHARDS, 2003) per un evidente fenomeno di omoplasia morfologica: in realtà le due specie non mostrano nulla in comune, né all'analisi filogenetica, né a quella genetica – oltre ad essere ecologicamente e geograficamente distinte. Il gruppo *P. pedemontana* - *P. cottia* - *P. apennina* appare come il risultato di speciazione relativamente recente, ed è forse derivato dal frazionamento dell'areale di un ancestrale diffuso fra le Alpi Cozie e l'Appennino Settentrionale. Una spiegazione alternativa vedrebbe la migrazione di una specie ancestrale dalle Alpi Marittime, attraverso gli Appennini, seguita dall'estinzione delle popolazioni intermedie; i crinali su cui *P. apennina* cresce, sono gli unici del complesso appenninico settentrionale che superano i 2000 metri e sono caratterizzati da substrati silicei (CREMA *et al.*, 2009). Questi crinali erano ricoperti dai ghiacci durante le ultime glaciazioni (GIRAUDI, 2003), tuttavia i crinali più bassi in cui la specie ad oggi è insediata potrebbero essere serviti da rifugio durante i periodi freddi o, alternativamente, come via di colonizzazione. La datazione dell'orologio molecolare suggerisce che la cladogenesi entro questo gruppo sia avvenuta al termine dell'ultimo Periodo Glaciale, forse in conseguenza del riscaldamento climatico.

Primula palinuri – La più problematica delle specie della sottosezione, è l'unica specie mediterranea ed è l'unica di ambiente costiero. Più volte è stato ipotizzato un possibile rapporto filogenetico fra *P. palinuri* e *P. auricula*, l'unica specie della sezione presente nella Penisola Italiana, oltre che l'unica altra specie a fiori gialli (RICHARDS, 2003): questa ipotesi, basata su una mera considerazione geografica, non trova conferma nella ricostruzione filogenetica: infatti il dendrogramma basato sulle distanze di Nei indica che *P. palinuri* è la specie più divergente, ed è sister a tutte le altre specie; inoltre, nella PCO (Fig.2) la sua distanza da *P. auricula* è maggiore della distanza da altre specie. Le peculiari caratteristiche morfologiche ed ecologiche di *P. palinuri* hanno indotto alcuni autori (WANNER, 1943; CHIARUGI 1941, 1952; ZHANG, 2002) ad ipotizzare che essa sia la specie più antica della sezione, mentre CHIARUGI (1952, 1956) propone di creare per questa specie una sezione monospecifica, *Paleoauricula*. Il presente studio corrobora l'ipotesi della separazione antica di *P. palinuri* dal resto della sezione, a partire da una paleospecie ad ampia distribuzione, prima dell'inizio della grande cladogenesi sviluppatasi durante il Periodo Würmiano. Da un punto di vista tassonomico, l'inclusione o meno di *P. palinuri* nella Sottosez. *Euauricula* rimane un tema aperto, data la sua posizione al margine della sottosezione stessa.

Ipotesi evolutive

La distribuzione e la diversità delle specie vegetali alpine sono generalmente spiegate meglio dall'ipotesi della vicarianza piuttosto che dalla dispersione a lungo raggio (KROPF *et al.*, 2006) e ciò pare plausibile anche nel caso delle primule della Sottosez. *Euauricula*. L'ipotesi di base che sottende al modello di vicarianza della speciazione simultanea è che l'areale di un ancestrale comune includesse le aree geografiche dove sono distribuite ora le specie derivate, e che l'areale ancestrale sia andato incontro a frammentazione, determinando isolamento geografico, e quindi genetico, fra le popolazioni, dando avvio ad un processo di progressiva divergenza, sia per deriva genetica, data la piccola dimensione di alcune popolazioni, sia per meccanismi di adattamento (COMES & KADEREIT, 2003). Alla vicarianza geografica si sarebbe sommata la vicarianza ecologica, da cui sarebbe derivato il più giovane clade delle primule acidofile.

In questo quadro di interpretazione vicariantista della speciazione e dell'endemismo nelle Alpi, grande importanza è stata attribuita all'ipotesi della sopravvivenza delle popolazioni isolate nei nunatakker, ipotesi sviluppata da molti autori (fra i più recenti REISIGL, 1995). Senza escludere l'importanza delle aree di rifugio nella sopravvivenza di alcune specie attraverso le fasi fredde del Pleistocene, è stato dimostrato che esistono specie endemiche la cui distribuzione attuale è meglio spiegata con l'alternarsi di contrazioni ed espansioni degli areali, estinzioni locali e conseguente isolamento delle popolazioni superstiti, a causa delle oscillazioni climatiche (KADEREIT *et al.*, 2004), oltre che con considerazioni ecologiche e litologiche (RAVAZZI, 1997, per il caso di *Primula glaucescens* e *P. spectabilis*). Tale modello dinamico di successive espansioni e contrazioni si attaglia anche ad un gruppo come *P. pedemontana* - *P. cottia* - *P. apennina*. I periodi caldi, con lo sviluppo della vegetazione forestale verso l'alto, possono aver determinato condizioni di isolamento per le specie rupicole di altitudine, mentre i periodi freddi possono aver rappresentato momenti di diffusione e confluenza degli areali. Emblematico in questo senso è il caso di *P. recubariensis* - *P. albenensis*, la cui mutua somiglianza non trova spiegazione se si fa riferimento al modello della sopravvivenza in aree di rifugio, mentre può essere spiegata assumendo un recente frazionamento dell'areale legato al riscaldamento climatico dal tardo Pleistocene all'Olocene. Nella stessa regione pre-alpina, un caso di frazionamento dell'areale attribuibile ai cambiamenti vegetazionali dell'Olocene, con conseguente differenziamento genetico, è stato evidenziato in *Cytisus emeriflorus* Rchb. (CONTE & CRISTOFOLINI, 2000).

L'ipotesi che le primule endemiche della Sottosez. *Euauricula* rappresentino il risultato di un processo dinamico, piuttosto che di una permanenza residuale in aree di rifugio, è corroborata anche dai dati cariologici: tutte le specie studiate cariologicamente sono risultate poliploidi con numero cromosomico sporofitico

da $2n = 62$ a $2n = 66$ (CHIARUGI, 1956; GIORDANI *et al.*, 1980; FAVARGER, 1965; HONSELL, 1961; KOVAÈEVLE, 1980; KRESS, 1963, 1989; JESSEN & LEHMANN, 2005), L'omogeneità delle specie su un livello interpretabile come esaploide, su base $x = 11$, con marginali fenomeni di aneuploidia, si concilia con l'ipotesi di un comune dinamismo piuttosto che con l'ipotesi di relittualità delle specie. La sola eccezione è costituita da *P. palinuri*, per la quale domina $2n = 66$ (HONSELL, 1961; KRESS, 1963, 1989), ma in una popolazione calabra è stato contato $2n = 44$ (GARBARÌ, 1974): l'esistenza di una popolazione tetraploide corrobora l'ipotesi che questa sia l'unica specie con spiccato carattere di relittualità.

Conclusioni ed implicazioni conservazionistiche

Le specie di *Primula* Subsect. *Euauricula* rappresentano un caso esemplare per lo studio della biogeografia storica e della genesi dell'endemismo orofitico Sud-Europeo. I modelli evolutivi che si riscontrano in questo gruppo possono essere estesi ad altri gruppi di distribuzione simile.

Un aspetto rilevante di questo complesso di specie riguarda l'alto livello di biodiversità: su un totale di 16 taxa ad oggi noti, 10 sono endemici, di cui 7 si possono considerare come endemismi puntiformi, diffusi in una singola area, in qualche caso noti con una singola popolazione ed un numero ridottissimo di individui, mentre la sola *P. auricula* è orofita sud-europea ad ampia distribuzione. Tale caratteristica di rarità rende le primule di questo gruppo estremamente importanti sotto il profilo della conservazione della biodiversità. Gli ambienti poco accessibili in cui vegeta la maggior parte delle specie le pone al riparo da attacchi diretti alla sopravvivenza. Tuttavia, alta è la vulnerabilità di fronte a cambiamenti climatici ed ambientali in generale. La riproduzione può essere mediata efficacemente da una singola specie di insetto, come dimostrato in *P. apennina*, e questa è una prima causa di vulnerabilità; in secondo luogo, variazioni climatiche anche modeste possono ridurre la fitness delle specie nelle piccole nicchie ecologiche occupate. Data la ridotta consistenza numerica di molte popolazioni di queste specie, qualsiasi contrazione della consistenza delle popolazioni le può portare al di sotto della soglia di popolazione minima vitale. In definitiva, un attento monitoraggio della consistenza delle popolazioni è altamente auspicabile.

Tassonomia e nomenclatura

In base ai risultati presentati e discussi, si propone di elevare *Primula hirsuta* subsp. *valcuvianensis* al rango di specie, con la proposta nomenclaturale seguente:

***Primula valcuvianensis* (S. Jess. & L. Lehm.) Cristof. & Crema stat. nov.**

BASION. *Primula hirsuta* subsp. *valcuvianensis* S. Jess. & L. Lehm., Sammelblätt. Gebirgspflanzen 3, 22.01.2., 2005.

RINGRAZIAMENTI

Il prof. Joachim Kadereit, la dott. Gertrud Schorr e il tecnico Marion Kever, dell'Institut für Spezielle Botanik, Universität Mainz, sono stati di guida per le analisi molecolari e ci hanno fornito molti campioni; il dott. Umberto Mossetti e la dott. Annalisa Managlia, dell'Erbario ed Orto Botanico dell'Università di Bologna, il dott. Pino Falgheri con il Gruppo della Flora Alpina Bergamasca, il dott. Filippo Prosser del Museo Civico di Rovereto, ci sono stati di grande aiuto nelle raccolte in campo. A tutti questi vogliamo esprimere la nostra sincera gratitudine.

BIBLIOGRAFIA

- AESCHIMAN D., LAUBER K., MOSER D.M., THEURILLAT J.-P., 2004 - Flora Alpina. 3 voll. Zanichelli, Bologna.
- BANFI E. & FERLINGHETTI R., 1993 - *Primula albenensis* sp. nov., una nuova entità del sottogenere *Auriculastrum* nelle Prealpi Bergamasche (Alpi sudorientali, Lombardia). *Webbia* 47(1): 203-212.
- BONIN A., EHRICH D. & MANEL S., 2007 - Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16: 3737-3758.
- BOGLIONI L. & FALGHERI P., 1996 - Scoperta di numerose stazioni di *Primula albenensis* nel gruppo dell'Aralalta: osservazioni preliminari. *Not. Florist. Flora Alpina Bergamasca*, 10: 13-14.
- CHIARUGI A., 1941- Sul numero dei cromosomi della *Primula palinuri* Petagna. *Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s.*, 47: 519-520.
- CHIARUGI A. 1952 - *Primula palinuri* Petagna, il celebre endemismo della costa tirrenica della Lucania. *Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s.*, 59: 465-466.
- CHIARUGI A., 1956 - *Primula palinuri* Petagna - posizione sistematica e significato fitogeografico attraverso l'indagine citogenetica. *Webbia*, 11: 861-888.
- COMES H. P. & KADEREIT J. W., 2003 - Spatial and temporal patterns in the evolution of the flora of the European Alpine System. *Taxon*, 52: 451-462.
- CONTE L., CRISTOFOLINI G., 2000 - Intraspecific diversity of *Cytisus emeriflorus* Reichenb. (*Leguminosae*), an endemic plant with disjunct distribution: evidence from isozyme data. *Pl. Biosystems*, 134 (3): 373-384.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 - An annotated checklist of the Italian Vascular Flora. *Palombi*, Roma.
- CORANDER J. & MARTTINEN P., 2005 - BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure - Manual v. 3.2. *University of Helsinki*. Helsinki.

- CORANDER J., MARTTINEN P., SIRÈN J., TANG J., 2008 - BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure - Manual v. 3.2. *Abo Akademy University*.
- CREMA S., CRISTOFOLINI G., ROSSI M., CONTE L., 2009 - High genetic diversity detected in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae) using ISSR fingerprinting. *Pl. Syst. Evol.*, 280: 29-36.
- FAVARGER C. - 1965 - Notes de caryologie alpine. IV. *Bull. Soc. Neuchateloise Sci. Nat.*, 88: 60.
- FISOJNI A., CRISTOFOLINI G., PODDA L., GALLONI M., 2011 - Reproductive ecology in the endemic *Primula apennina* Widmer (Primulaceae). *Pl. Biosystems*, 145: 353-361.
- GARBARI F., 1974 - Cariologia, citogeografia, corologia della flora italiana e suoi aspetti tassonomici. *Lav. Soc. Ital. Biogeogr., n.s.*, 4: 111-123.
- GIRAUDI C. 2003 - Middle Pleistocene to Holocene Apennine Glaciation (Italy), *Il Quaternario*, 16: 37-48.
- GIORDANI A., MICELI P., MONTI G., 1980 - Numeri cromosomici per la flora italiana: 789-793. *Inform. Bot. Ital.*, 12(3): 327-332.
- HAMMER Ø., HARPER D. A. T. & RYAN P. D., 2001 - PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 1-9.
- HONSELL E., 1961.- La diffusione delle forme esaploidi di *Primula palinuri* Petagna in diverse stazioni della costa tirrenica da Palinuro a Scalea. *Ann. Bot.*, 27 (1): 135-144.
- JESSEN S. & LEHMANN L., 2005 - *Primula hirsuta* subsp. *valcuwianensis* subsp. nova - ein Lokalendemit der südlichen Voralpen, provinz Varese (sect. Auricula, Primulaceae). *Sammelblätt. Gebirgspflanzen*, 3, 22.01.2.
- KADEREIT J. W., GRIEBELER E. M. AND COMES H. P., 2004 - Quaternary diversification in European alpine plants: pattern and process. *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser B*, 359: 265-274.
- KELSO S., BEARDSLEY P. M. & WEITEMIER K., 2009 - Phylogeny and biogeography of *Primula* sect. *Parryi* (Primulaceae). *Int. J. Pl. Sci.* 170(1): 93-106.
- KOVAÈEVLÈ M., 1980 - New lights concerning the relationships within the polymorphic species *Primula auricola* L. *Acta Bot. Croat.*, 39: 153-164.
- KRESS A. 1963 - Zytotaxonomische Untersuchungen an Primulaceen. *Phyton*, 10: 225-236.
- KRESS A. 1989 - Primulaceen-Studien 10: Chromosomenzählungen an verschiedenen Primulaceen. Teil. C: *Primula*, Sectio Auricula. *Gröbenzell*, München.
- KRESS A., 1997 - *Primula*. In: Castroviejo S., Aedo C., Laínz M., Morales M., Muñoz Garmendia F., Nieto Feliner G., Paiva J. (eds.) : *Flora Iberica*, vol. 5. CSIC, Real Jardín Botánico, Madrid.
- KROPF M., COMES H. P. & KADEREIT J. W. 2006 - Long-distance dispersal vs vicariance: the origin and genetic diversity of alpine plants in the Spanish Sierra Nevada. *New Phytol.* 172: 169-184.

- KROPP M., COMES H.P. & KADEREIT J.W., 2009 - An AFLP clock for the absolute dating of shallow-time evolutionary history based on the intraspecific divergence of southwestern European alpine plant species. *Mol. Ecol.*, 18 (4): 697-708.
- MOSER D.M., 1998 - Ein neuer Reliktendemit der Grigna Meridionale, Provincia di Como, Italien: *Primula grignensis* D.M. Moser (sect. *Auricula*, subsect. *Erythrodrosum* Schott.). *Candollea*, 53 (2): 387-393.
- MUELLER U.G. & WOLFENBARGER L. L., 1999 - AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecol. and Evol.*, 14: 389-394.
- NEI M. & LI W. H., 1979 - Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 5269-5273.
- PLEINES T. & BLATTNER F. R., 2008 - Phylogeography of American diploid *Hordeum*. *Taxon*, 57(3): 875-881.
- PROSSER F. & SCORTEGAGNA S., 1998 - *Primula recubariensis*, a new species of *Primula* sect. *Auricula* Duby endemic to the SE Prealps, Italy. *Willdenowia*, 28: 27-46.
- RAVAZZI C., 1997 - Distribuzione ed ecologia di due primule endemiche delle Pralpi calcaree meridionali, *Primula glaucescens* e *P. spectabilis*, e considerazioni sulla loro corogenesi. *Arch. Geobot.*, 3 (2): 125-148.
- REISIGL H., 1995 - Insubrien und das Gardagebiet. Vegetation, Florengeschichte, Endemismus. *Ann. Museo Civ. Rovereto*, 11: 9 - 2
- RICHARDS J., 2003 - *Primula*. Second Ed. *Timber Press*, Portland, USA.
- SAITOU N. & NEI M., 1987 - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- SCHORR G., HOLSTEIN N., PEARMAN P. B., GUISAN A. & KADEREIT J. W., 2012 - Integrating species distribution models (SDMs) and phylogeography for two species of Alpine *Primula*. *Ecol. Evol.*, 2(6): 1260-1277.
- SCHARFETTER R. 1953 - Biographien von Pflanzensippen. *Springer*, Wien.
- SOKAL R. & MICHENER C., 1958 - A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bull.*, 38: 1409-1438.
- SWOFFORD D. L., 2000 - PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA, USA.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M., 1995 - AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407-4414.
- WANNER H. 1943 - Zur Karyologie der Gattung *Primula* L. Sektion *Auricula* Duby. *Planta*, 33: 635-652.
- WHITLOCK R., HIPPERSON H., MANNARELLI M., BUTLIN R. K. & BURKE Y., 2008 - An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error. *Molecular Ecology Resources*, 8(4): 725-735.
- YEH F. C., YANG R.C., BOYLE T., YE Z.H. & MAO J.X., 1997 - POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta*, Edmonton.

- ZHANG L.B. 2002 - Phylogeny, biogeography and systematics of *Soldanella* L. & *Primula* L. sect. *Auricula* Duby (Primulaceae) based on molecular and morphological evidence. *Cuvillier*, Göttingen.
- ZHANG L.B., COMES H.P. & KADEREIT J. W., 2004 - The temporal course of quaternary diversification in the European high mountain endemic *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae). *Int. J. Pl. Sci.*, 165(1): 191-207.
- ZHANG L.B. & KADEREIT J.W., 2004 - Classification of *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. *Bot. J. Linn. Soc.*, 146: 1-26.
- ZHANG L.-B. & KADEREIT J.W., 2005 - Typification and synonymization in *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae). *Taxon*, 54(3): 775-788.

Indirizzo degli autori:

Silvia Crema & Giovanni Cristofolini - Erbario ed Orto Botanico, Università di Bologna -
Via Irnerio 42 - I-40126 Bologna
silviacrim76@yahoo.it | giovann.cristofolini@unibo.it
