

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Evoluzionistica

Meccanismi ecologici di isolamento riproduttivo tra diploidi e tetraploidi di *Anacamptis pyramidalis*

Relatore: Prof. Livio Trainotti
Dipartimento di Biologia
Correlatore: Prof. Salvatore Cozzolino
Università di Napoli Federico II

Laureando: Luca Pegoraro

Anno Accademico 2013/2014

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Definizioni di specie	1
1.2	Barriere riproduttive	2
1.3	Speciazione	4
1.4	Poliploidia	6
1.5	Le Orchidee mediterranee	8
1.6	Caso di studio	10
2	Materiali e Metodi	13
2.1	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	13
2.2	Siti di studio	13
2.3	Morfometria florale	14
2.3.1	Misura tratti floreali	14
2.3.2	Analisi statistica	15
2.4	Colorazione del labello	16
2.5	Altezza e numero di fiori	16
2.6	Fitness	16
2.7	Correlazione tratti morfologici e fruit set	17
2.8	Fenologia	17
2.8.1	Isolamento fenologico	17
2.9	Struttura spaziale delle popolazioni	18
2.9.1	Mappatura	18
2.9.2	Conversione coordinate	18
2.9.3	Stima della probabilità di impollinazione incrociata in base alla distribuzione dei citotipi	19
2.10	Citometria di flusso	20
2.11	Pollen transfer	21
2.11.1	Allestimento plot sperimentali	21
2.11.2	Colorazione del polline	21
2.12	Incroci e vitalità dei semi	22
2.12.1	Impollinazioni manuali	22
2.12.2	Vitalità dei semi	23
2.13	Indici di isolamento riproduttivo	23
2.13.1	$R_{\text{PHENOLOGY}}$	23
2.13.2	$R_{\text{MICROHABITAT}}$	24
2.13.3	$R_{\text{PRE-POLL}}$	24
2.13.4	$R_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}}$	24
2.13.5	R_{EMBRYO}	24

2.13.6	RI _{HYBRID}	25
2.13.7	T: isolamento complessivo	25
3	Risultati	27
3.1	Morfometria florale	27
3.1.1	Misura tratti floreali	27
3.1.2	Analisi statistica	28
3.2	Colorazione del labello	29
3.3	Altezza e numero di fiori	30
3.4	Fitness	30
3.5	Correlazioni tratti morfologici e fruit set	32
3.6	Fenologia	33
3.6.1	Isolamento fenologico	34
3.7	Struttura spaziale delle popolazioni	35
3.7.1	Stima della probabilità di impollinazione incrociata in base alla distribuzione dei citotipi	36
3.8	Citometria di flusso	36
3.9	Pollen transfer	38
3.10	Incroci e vitalità dei semi	38
3.10.1	Impollinazioni manuali	38
3.10.2	Vitalità dei semi	38
3.11	Indici di isolamento riproduttivo	39
3.11.1	RI _{PHENOLOGY}	39
3.11.2	RI _{MICROHABITAT}	40
3.11.3	RI _{PRE-POLL}	40
3.11.4	RI _{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}	40
3.11.5	RI _{EMBRYO}	40
3.11.6	RI _{HYBRID}	40
3.11.7	T: isolamento complessivo	41
4	Discussione	43
4.1	Divergenza ecologica e fenotipica	44
4.2	Isolamento riproduttivo	47
5	Conclusioni	51
A	Altro materiale	55

Capitolo 1

Introduzione

Una delle più straordinarie caratteristiche delle Angiosperme è la loro diversità. La biologia evoluzionistica ha tra i propri obiettivi principali comprendere i processi che hanno portato a questa diversità. Sin da Darwin ([11]) si ritiene che gli impollinatori ricoprano un ruolo importante nella diversificazione delle Angiosperme, infatti la maggioranza di queste dipendono da vettori animali per l'impollinazione, e la selezione per impollinatori è stata suggerita essere una delle spinte evolutive più rilevanti per la speciazione delle piante ([23]). L'idea che le specie si originassero per selezione naturale proposta da Darwin solo recentemente ha trovato consenso presso il programma di ricerca evoluzionista, che, dopo un periodo in cui l'accento era stato posto sui processi genetici, concorda che è la selezione naturale la spinta primaria alla speciazione ([47]).

1.1 Definizioni di specie

La visione di come la speciazione avvenga è influenzata da come è definita una specie, pertanto non si può prescindere da una breve panoramica sulle definizioni più importanti.

Linneo (*Systema naturae*, 1759) catalogava gli organismi viventi in morfospécie, sulla base dei soli caratteri morfologici. Sebbene il criterio sia ancora utilizzato entro certi limiti, questa definizione è inapplicabile a vasti domini della vita (es.: specie con grande variabilità morfologica o dimorfismo sessuale, specie criptiche). Darwin ([11]) non nega la realtà ontologica delle specie, ma ritiene siano oggettivamente indefinibili, etichette arbitrarie assegnate dai tassonomi al continuum della variabilità tra specie, sottospecie e varietà (definizione convenzionalistica). Secondo la definizione di biospecie di Mayr (1940), una specie è un insieme di popolazioni effettivamente o potenzialmente interfeconde, tenuto separato da altri insiemi di popolazioni per mezzo di meccanismi di isolamen-

to riproduttivo. Questa influente definizione è ancora oggi ampiamente utilizzata, ma presenta delle inconsistenze negli organismi a riproduzione asessuata. Van Valen (1976) coniò una definizione ecologica di specie, circoscritta cioè dalla sua nicchia ecologica: un set di adattamenti unici e divergenti da quelli di altre specie. Questa definizione si basa sul principio di esclusione competitiva di Volterra-Gause ([53]), secondo cui due specie che condividono la stessa risorsa (limitata) non possono coesistere; gli esiti della competizione sono due: l'estinzione di uno dei contendenti oppure la specializzazione in due nicchie diverse. La definizione filetica (o evolutiva) di specie si basa sul principio di divergenza ([11]): la parentela tra le specie è inversamente proporzionale all'antichità del loro ancestratore comune. L'accento qui è posto sulle relazioni evolutive tra specie, e non su caratteristiche morfologiche od ecologiche, aggirando in parte le difficoltà delle definizioni precedenti. La circoscrizione di una linea filetica non è tuttavia sempre semplice.

Una proposta per uscire dall'*empasse* è considerare le specie come categorie scalari ([38]): sono reali, ma eludono una categorizzazione univoca perché sfumano l'una nell'altra.

1.2 Barriere riproduttive

È interessante notare come in molte definizioni di specie sia considerato l'isolamento riproduttivo, ovvero l'interposizione di barriere al flusso genico. È infatti un requisito per la formazione e mantenimento delle specie che i pool genici rimangano separati. Le barriere riproduttive possono essere suddivise in due categorie: pre e post-zigotiche.

Meccanismi che prevengono il contatto tra i gameti di specie (o popolazioni, ecotipi, varietà, ecc) diverse, o ne prevengono la fusione, sono detti pre-zigotici.

Uno dei meccanismi di isolamento più importanti e diffusi è quello spaziale: chiaramente, se due popolazioni si trovano troppo distanti perché possano incrociarsi saranno isolate riproduttivamente. Questa barriera assume però innumerevoli sfaccettature che richiedono un'analisi approfondita, caso per caso, di quale sia l'effettivo grado di isolamento provocato ([45], [47]). Se, ad esempio, due specie di piante condividono un impollinatore poco mobile, la distanza sufficiente ad isolarle sarà minore di quella necessaria ad isolare due specie con impollinatori molto mobili ([26]).

Un altro tipo di barriera molto comune è l'asincronia riproduttiva, sia a livello stagionale (fenologia) che a scala più piccola (es.: antesi diurna o notturna). L'isolamento fenologico può derivare sia da fattori intrinseci (genetici) sia da fattori estrinseci (altitudine,

fattori edafici, ecc), e genera isolamento tramite accoppiamento assortativo (non-random mating) ([26], [47], [3]).

L'incompatibilità degli apparati riproduttivi è da tempo riconosciuta come ostacolo all'incrocio interspecifico, tanto negli animali (incompatibilità degli organi genitali) quanto nelle piante. In queste ultime l'isolamento è imputabile a differenze morfologiche del fiore, che aumentano la probabilità di ricezione di polline omospecifico, sia nelle specie anemofile che zoofile. La selezione per impollinatori è spesso invocata come spiegazione della diversificazione delle Angiosperme, sebbene non sia l'unica ([24]).

L'incapacità dei gameti di fondersi correttamente e proseguire le divisioni cellulari è detta incompatibilità gametica, ed è un meccanismo di isolamento riproduttivo importante sia negli animali (es.: coralli) sia nelle piante. Infatti, benché il polline sia frequentemente in grado di germinare sullo stigma di un'altra specie, il tubetto pollinico viene arrestato nella crescita ad un certo punto, impedendo la fertilizzazione delle cellule uovo ([8]).

Negli animali è importante inoltre la selezione sessuale, soprattutto in specie dotate di comportamenti volti alla scelta del partner (es.: display sessuali, corteggiamento). L'accoppiamento assortativo, anche in assenza di altre spinte selettive, è in grado di generare isolamento riproduttivo, agendo di per sé come ostacolo al flusso genico e consentendo inoltre la divergenza per accumulo di mutazioni ([43]).

Barriere che intervengono dopo la fecondazione sono dette post-zigotiche.

Alterazioni dello sviluppo in zigoti ibridi, che causano mortalità dell'embrione, sono componenti importanti nell'isolamento riproduttivo di molti animali e piante. Nei primi sono imputabili a sistemi di sviluppo embrionali incompatibili nei genomi parentali, nelle seconde al collasso dell'endosperma, spesso dovuto a differenti livelli di ploidia dei genitori ([28]).

Anche quando si formasse un embrione vitale, l'ibrido risultante potrebbe soffrire di disturbi fisiologici gravi che ne inficerebbero la capacità riproduttiva. Interazioni cromosomiche e geniche disarmoniche possono inoltre impedire la produzione di gameti vitali. Infine, quand'anche l'ibrido possedesse gameti funzionali, potrebbe comunque non essere in grado di riprodursi, specialmente se i genitori appartengono a specie con sistemi di riconoscimento o impollinazione specializzati ([26], [4], [24]); infatti, la commistione dei genomi parentali altererebbe i tratti coinvolti nel riconoscimento reciproco, prevenendo il backcrossing.

L'incrocio tra popolazioni adattate ad ambienti diversi produrrà ibridi con adattamenti "intermedi", che saranno meno performanti di ciascuno dei genitori (fall-between-niches); è quindi l'interazione con l'ambiente a determinare la bassa fitness degli ibridi, de-

terminando selezione contro gli immigranti ([27]). La prole ibrida ha generalmente una fitness minore perché risulta dalla fusione di due genomi, ed il genotipo risultante non ha subito l'azione della selezione naturale.

Un ulteriore, fondamentale meccanismo nell'innalzamento delle barriere riproduttive tra specie è il reinforcement, che si configura come accoppiamento assortativo ed ha l'effetto di limitare l'occorrenza di incroci interspecifici quando questi hanno fitness minore degli incroci intraspecifici. È così importante perché può potenzialmente portare all'isolamento riproduttivo due popolazioni che presentano una divergenza di qualche tipo, ma che da sola non sarebbe in grado di impedire l'omogenizzazione del pool genico. Il reinforcement è cioè in grado di completare il processo di speciazione una volta che questo è stato iniziato da un altro fattore ([8]).

Nel complesso, barriere di tipo ecogeografico sembrano dare il contributo maggiore all'isolamento tra specie strettamente imparentate, mentre barriere post-zigotiche sembrano partecipare molto meno ([47]).

1.3 Speciazione

Le specie possono avere origine in modi diversi.

La speciazione allopatrica coinvolge due popolazioni che perdano il reciproco contatto riproduttivo. Ciò può avvenire per migrazione di una piccola porzione di popolazione (speciazione peripatrica) o per insorgenza di una barriera geografica. Le popolazioni così isolate tenderanno a divergere per selezione, deriva, accumulo di mutazioni. Se è trascorso abbastanza tempo, anche con l'eliminazione delle barriere di segregazione le popolazioni non si reincroceranno, rimanendo isolate riproduttivamente ([32]).

Si dice parapatrica una speciazione che coinvolge popolazioni con areali distinti ma adiacenti, con una ristretta zona di contatto. Tali popolazioni, se sottoposte ad un gradiente di selezione lungo l'habitat comprendente i loro areali, tenderanno a divergere formando due specie distinte. La particolarità del processo è che il flusso genico non viene interrotto completamente, ma l'accoppiamento assortativo o la divergenza ecologica producono infine l'isolamento riproduttivo ([43]).

La speciazione simpatica è ancora oggi argomento di intenso dibattito, e non c'è accordo comune sulle sue cause e sul suo contributo complessivo alla diversità dei viventi ([14], [6]). Questa speciazione richiede la formazione di una barriera riproduttiva tra due gruppi all'interno di una popolazione che occupa la medesima area geografica o nicchia ecologica. Tale prerequisito è difficile da

dimostrare, perché l'isolamento di popolazioni simpatriche potrebbe derivare da contatto secondario di popolazioni diversificatesi in allopatria o da una varietà di altri processi. Maynard-Smith ([31]) propose per primo un modello di speciazione simpatica basato sull'innalzamento di barriere riproduttive in seguito ad adattamento a nicchie leggermente diverse (selezione divergente), nello stesso range geografico ed in presenza di random mating. Evidenze di questo fenomeno si stanno accumulando ([46], [17], [29], [41], [64]), ma, in parte per le diverse definizioni di simpatria utilizzate, la controversia non sembra risolta. Un approccio promettente in questo senso sta nel considerare speciazione allopatrica e simpatica come gli estremi di un continuum di infiniti livelli di isolamento geografico e riproduttivo ([45], [6], [14]).

Si parla di speciazione ecologica quando selezione divergente su tratti di popolazioni in ambienti differenti provoca, direttamente o indirettamente, l'evoluzione dell'isolamento riproduttivo ([52]).

Questo può evolvere come effetto collaterale dell'adattamento a diverse nicchie, oppure può essere selezionato direttamente. Ciò accade in genere quando l'incrocio eterospecifico ha fitness ridotta ed è quindi controselezionato (reinforcement).

Nelle piante la speciazione ecologica può avvenire ad opera dei pronubi ([24]). Le preferenze degli impollinatori (e gli impollinatori stessi) variano da area ad area, quindi popolazioni di una stessa specie in territori diversi saranno sottoposte a diversi regimi selettivi determinati dagli impollinatori locali, ed evolveranno caratteri fiorali differenti. Una volta che tali caratteri hanno raggiunto una certa specializzazione, la divergenza accumulata contribuirà all'isolamento riproduttivo, consentendo infine alle due linee di evolvere indipendentemente ([23]). Sebbene in teoria la speciazione per impollinatori possa avvenire anche in presenza di flusso genico, la maggior parte dei casi coinvolge l'isolamento geografico ([8], [23]).

La speciazione ecologica può derivare anche dall'adattamento a diversi habitat. In questo caso, le piante si adattano ad ambienti con caratteristiche diverse (umidità, temperatura, composizione chimica, regimi di erbivoria, malattie), e l'isolamento riproduttivo evolve come effetto collaterale; ciò è possibile sia in allopatria che in parapatria ([20]). In allopatria, l'isolamento può evolvere per incompatibilità delle mutazioni sorte nelle popolazioni (modello di Bateson-Dobzansky-Muller), e sembra essere il caso predominante ([8]). In altri casi le barriere riproduttive possono essere il diretto effetto pleiotropico dei geni coinvolti nell'adattamento all'ambiente ([45]).

Spesso la selezione per impollinatori e l'adattamento all'habitat agiscono di concerto. Infatti, l'adattamento agli impollinatori locali favorirà anche l'adattamento a quell'habitat, riducendo l'ingresso

di geni alloctoni. D'altra parte, essendo spesso la distribuzione degli impollinatori a mosaico, avviene anche il contrario ([23]). Infine, l'adattamento all'ambiente può causare cambiamenti nei tratti florali che, a loro volta, influenzeranno l'attrazione dei pronubi ([61]).

1.4 Poliploidia

L'unico tipo universalmente accettato di speciazione simpatica è la speciazione per poliploidia. Si tratta di un improvviso isolamento genico tra due gruppi di individui in seguito ad un evento puntuale (poliploidizzazione) che innalza, nell'arco di una o poche generazioni, barriere al flusso genico (quantum speciation).

La poliploidia è la presenza in un organismo di 3 o più set completi di cromosomi rispetto alla specie d'origine ([40]).

I poliploidi sono classificati in base all'origine dei cromosomi ([56]): autopoliploidi, quando derivano dalla duplicazione di uno stesso genoma (es.: AAAA); si dicono autopoliploidi interrazziali quando sono frutto di fusione di gameti non ridotti, in tal caso i cromatidi non saranno tutti fratelli (AAA*A*). Allopoliploidi, quando derivano dall'unione di due o più genomi (AABB); si dicono allopoliploidi segmentali se i genomi parentali presentano solo alcune regioni di omologia (AA* B CC*). Aneuploidi non sono invece poliploidi, e derivano dalla perdita o guadagno di uno o pochi cromosomi, condizione che spesso risulta dannosa.

La poliploidia può avere origine in vari modi ([58]): duplicazione somatica nel corso della mitosi, per polispermia (fecondazione di una cellula uovo da parte di più nuclei spermatici) o per non riduzione gametica. Se la duplicazione somatica avviene nello zigote (può venire indotta da stress), allora viene trasmessa alle generazioni successive. La duplicazione somatica può anche essere costitutiva in alcuni tessuti, formando chimere poliploidi ([56], [40]). La non riduzione gametica, cioè l'acquisizione di cromosomi addizionali durante la meiosi, è comune in alcuni gruppi e può aumentare in certe condizioni ambientali o in certi genotipi.

La poliploidia è distribuita irregolarmente a livello filogenetico nelle piante ([35]), ed è più diffusa in piante perenni a vita lunga, forse per le maggiori opportunità di incontro di gameti non ridotti, mentre mating system in esincrocio tendono a ridurla.

Condizioni aneuploidi sono spesso incompatibili con la sopravvivenza, o determinano comunque una grave riduzione di fitness.

Individui poliploidi sono invece in genere vitali, sebbene possano essere sterili, ma la perdita o la metilazione di frammenti di sequenze di DNA possono ripristinare la fertilità (i poliploidi possono tollerare la perdita di uno o più cromosomi) ([40]). Molte piante

coltivate sono poliploidi, come il grano (*Triticum aestivum*), che è un alloesaploide formato dall'ibridazione e successiva duplicazione del genoma di tre specie erbacee diploidi.

La poliploidizzazione causa riarrangiamenti organizzativi drammatici nelle prime generazioni dopo la duplicazione genomica ([15]). Gli elementi trasponibili (TE) vengono attivati e le possibili conseguenze deleterie sono tamponate dalle copie multiple dei geni. Si ritiene che l'attività dei TE sia inoltre responsabile della commistione dei geni parentali nel genoma ibrido. Si possono verificare anche eventi di modifica dei geni regolatori, che possono divergere nella loro funzione oppure venire silenziati reversibilmente ([30]).

A livello citologico i poliploidi tendono ad avere cellule più grandi (modifica del dosaggio di fattori coinvolti nel rapporto superficie/volume della cellula) con crescita e metabolismo più lento, ed il contenuto di DNA sembra essere inversamente proporzionale al tasso di crescita ed al numero di divisioni cellulari.

Un effetto della duplicazione genomica è anche un cambiamento delle preferenze ecologiche e della competitività ([42]). La miglior performance degli allopoliploidi in ambiente naturale si pensa possa essere dovuta non all'accresciuto numero cromosomico, ma a nuove combinazioni di geni che avrebbero maggiore potenziale adattativo. Gli autopoliploidi potrebbero avvantaggiarsi invece dell'aumento di diversità allelica ([54], [36]). Tra le conseguenze della poliploidia c'è anche un cambiamento nell'epoca di fioritura, spesso un anticipo, ma la direzione di tale cambiamento varia da caso a caso ([15], [36], [58], [42]).

Prevedere l'effetto della poliploidizzazione è difficile, ed i dati disponibili spesso non sono concordi. In genere, comunque, i poliploidi tendono a resistere meglio alla siccità, al freddo, alla scarsità di nutrienti, ai parassiti ed erbicidi ([42]).

Si riteneva che le specie poliploidi fossero generate una volta sola, da un evento puntiforme, e che potessero colonizzare un range più ampio dei parentali grazie alla maggiore eterozigotità, all'effetto tampone di alleli multipli ed alla flessibilità genica ([56]). Si riteneva anche che gli autopoliploidi fossero scarsamente adattabili. Recentemente si pensa invece che la poliploidia possa affermarsi nelle popolazioni naturali quando i suoi effetti fenotipici sono lievi oppure quando è favorita una rapida evoluzione. Molte specie poliploidi sono oggi considerate di origine multipla ([56], [35], [54]).

La poliploidia crea un nuovo gruppo di individui che si trova in simpatria con i genotipi che lo hanno generato, e può innescare dinamiche anche complesse di competizione con essi. In precedenza gli studi sui poliploidi si sono concentrati su un solo tipo di meccanismo per volta, trascurando le barriere post-zigotiche (es.: sterilità dell'ibrido), che si ritiene oggi abbiano invece un ruolo

determinante ([42]).

Condizioni di aneuploidia (aberrazioni nel numero di uno o pochi elementi dell'assetto cromosomico), se compatibili con la sopravvivenza dell'organismo, generano una barriera istantanea con i genomi parentali, compromettendo la compatibilità riproduttiva. Quando si verifica una successiva duplicazione dell'intero genoma (poliploidia), l'organismo risultante è generalmente vitale, e può essere riproduttivamente isolato dai parentali.

Il ruolo della poliploidia nell'evoluzione di nuove specie è controverso. È diffusa nel regno vegetale (in alcuni gruppi più che in altri) e meno in quello animale, ma sembra aver contribuito in entrambi all'attuale assetto genomico ([40], [5], [36], [58]).

1.5 Le Orchidee mediterranee

La famiglia delle Orchidaceae è una delle più numerose e diversificate, contando più di 200000 specie ed 800 generi. Nonostante l'hotspot di biodiversità per questo gruppo si trovi nelle regioni tropicali ([33]), soprattutto con specie epifite, nel bioma mediterraneo occorrono circa 200 specie, di cui 160 sono presenti anche in Italia ([13]).

Le specie europee sono geofite, hanno cioè habitus erbaceo perenne con apparati sotterranei che consentono il superamento della stagione avversa. Gli apparati ipogei sono bulbo-tuberi o rizotuberi, presenti in genere in coppia: uno fornisce le sostanze nutritive per l'emissione delle foglie, dei fiori e fruttificazione ed avvizzisce a fine stagione, mentre l'altro acquisisce sostanze di riserva per la successiva stagione vegetativa ([59]).

Le foglie sono a lamina intera e perlopiù basali, a volte cauline, che si riducono fino a brattee nell'infiorescenza spiciforme ad antesi acropeta (dal basso), portante un numero variabile di fiori.

Questi sono ermafroditi, ed androceo e gineceo sono fusi in un ginostemio. L'unico stame è modificato a formare due sacchi pollinici di massule di polline agglutinate in due strutture claviformi, detti pollinodi. Questi sono portati all'estremità di due caudicole, che alla base presentano una struttura detta viscidio o retinacolo, che aderisce al corpo degli impollinatori.

Il fiore delle Orchidee si compone di due verticilli di 3 tepali, tra loro opposti: quello esterno è costituito da due tepali sepaloidi esterni ed uno superiore, quello interno da due tepali petaloidi esterni e da un grande tepalo modificato con funzione vessillifera, il labello. Durante l'antesi il fiore subisce resupinazione, una rotazione di 180° a carico dell'ovario che porta il labello in posizione inferiore.

Contrariamente alle specie tropicali, che spesso stringono strette relazioni mutualistiche coi propri impollinatori fornendo ricompense di vario tipo (nettare, polline o persino olii aromatici), circa un terzo delle Orchidee delle regioni temperate non offre alcuna ricompensa ([2], [21]).

Due sono le strategie principali: inganno sessuale o alimentare. Nel primo caso, rappresentato nel genere *Ophrys* ad esempio, il labello porta disegni e villosità che richiamano l'addome della femmina di una specie di Imenottero, ed attira con complessi bouquet aromatici (che simulano i feromoni sessuali della femmina) i maschi di quella specie, che nel tentativo di accoppiarsi col fiore (pseudocopula) preleveranno i *pollinaria* (viscidi, caudicole e pollinodi nel loro complesso), ed alla visita al successivo fiore completeranno l'impollinazione. Nella seconda strategia, più diffusa, il fiore è spesso munito di un prolungamento sacciforme posteriore, lo sperone (o sprone), e di altri caratteri che imitano fiori nettariiferi, pur non producendo nettare. La mimesi fiorale è generalizzata, ed attrae impollinatori emersi da poco (perciò inesperti); sono rari i casi di specie temperate che esibiscono mimetismo batesiano nei confronti di una sola specie nettariifera ([48]). Mentre nel primo gruppo l'impollinazione è spesso affidata ad una singola specie (elevata specificità dei disegni e degli aromi floreali), e quindi l'isolamento pre-impollinazione è preponderante, nel secondo vengono attratte diverse specie di impollinatori in modo meno selettivo, pertanto è più probabile avvengano incroci interspecifici.

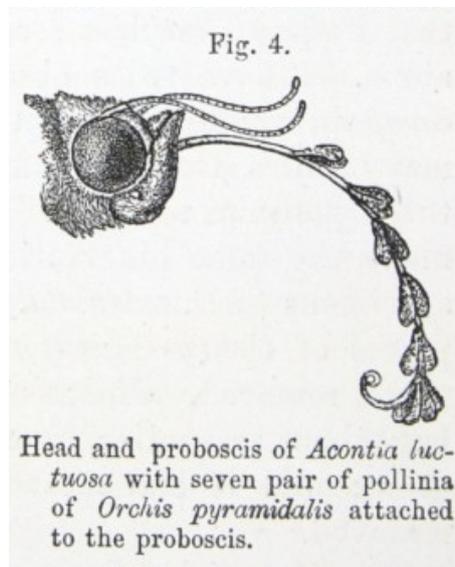
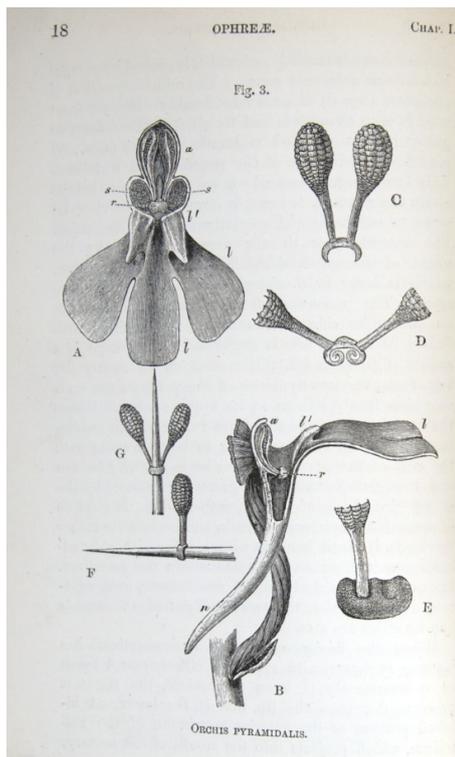
Ciononostante, gli ibridi di Orchidee ad inganno alimentare sono sorprendentemente rari, fatto che suggerisce la presenza di forme di isolamento post-impollinazione; queste sembrano essere invece deboli nelle specie ad inganno sessuale ([10]).

Un'altra peculiarità del ciclo biologico di queste piante è la formazione di frutti (capsule) contenenti migliaia di piccolissimi semi (<1 mm) pressoché privi di endosperma, dispersi dal vento. Non disponendo di riserve, la loro germinazione dipende dal legame simbiotico con un fungo nel terreno. Tutte le Orchidee sono miceterotrofe, almeno durante le fasi della germinazione, e stabiliscono un rapporto con funghi appartenenti solitamente al gruppo dei *Rhizoctonia*, saprofiti e patogeni di piante, non micorrizici obbligati. La maggior parte delle specie ritiene il micobionte anche da adulta (si ritiene dipenda parzialmente da questo per l'approvvigionamento minerale). Non è chiaro se il fungo benefici di alcun vantaggio nell'associazione con la pianta, che apparentemente si comporta come un parassita sfruttando le sostanze fornite dal simbionte. Alcune specie, soprattutto quelle prive di clorofilla, stabiliscono un'associazione altamente specifica con funghi ectomicorrizici in simbiosi con piante legnose nelle vicinanze, intromettendosi nella rete simbiotica e sfruttando i nutrienti forniti dall'ospite ([62]).

1.6 Caso di studio

La specie in esame in questo lavoro è *Anacamptis pyramidalis*, una delle Orchidee più comuni, che adotta la strategia dell'inganno alimentare.

Già Darwin, nel suo *The various contrivances by which Orchids are Fertilised by Insects* ([12]), si era stupito del meraviglioso adattamento che questa specie ha messo in atto per ottenere l'impollinazione tramite farfalle (figura 1.1): queste, inserendo la spiritromba nel lungo sperone alla ricerca di nettare, vengono in contatto con il rostellum posto all'imboccatura, liberando in tal modo il viscido che prontamente si incolla alla spiritromba. A contatto con l'aria poi, il viscido si indurisce e restringe, provocando la divergenza e flessione in avanti delle caudicole, che portano le masse polliniche, ad esso attaccate. In tal modo, alla successiva visita ad un altro fiore di *A. pyramidalis*, i *pollinaria* si trovano in una posizione ottimale per venire in contatto con gli stigmi vischiosi, che tratterranno alcune delle massule polliniche portando così a compimento l'impollinazione.



(a) Illustrazione delle parti del fiore.

(b) *Pollinaria* sulla spiritromba di una farfalla.

Figura 1.1: Illustrazioni di *A. pyramidalis* di Darwin.

Nel presente lavoro di tesi si è investigata la divergenza ecologica e le varie barriere di isolamento riproduttivo tra due citotipi (diploide e tetraploide) di *A. pyramidalis* in due stazioni dei Colli Berici, dove le due entità occorrono in simpatria. La relativa diffusione e numerosità della specie (che consentono l'utilizzo di tecniche limitatamente invasive), ed il fatto che le due ploidie siano distinguibili grazie a caratteri morfologici, rendono particolarmente adatto il sistema di studio per valutare in campo la divergenza ecologica e riproduttiva.

Un approccio che sta riscuotendo successo recentemente ([41], [17], [29]) è quello proposto da Coyne e Orr nel 1989 ([7]). Esso consiste nello stimare, con opportuni strumenti di indagine, il contributo di ogni barriera riproduttiva (pre e post-zigotica) all'isolamento complessivo tra due specie. L'applicazione di questo metodo su coppie di specie (o popolazioni) nelle prime fasi di divergenza consente di esplorare quali siano i fattori che ostacolano l'omogeneizzazione del pool genico di due "specie incipienti". Il confronto con specie con caratteristiche simili, ma in uno stadio più avanzato di divergenza, potrebbe poi fornire ulteriori dettagli sulle modalità e sui tempi necessari affinché l'isolamento riproduttivo possa affermarsi, gettando luce sulle possibili forze che promuovono la speciazione.

In particolare, gli obiettivi che questa tesi si prefigge sono:

- I citotipi diploide e tetraploide di *A. pyramidalis* si differenziano morfologicamente ed ecologicamente?
- Quali fattori ecologici sono determinanti nella coesistenza delle popolazioni simpatriche di *A. pyramidalis*?
- Oltre alla differenza nel livello di ploidia, quali altre barriere riproduttive contribuiscono all'isolamento tra le due ploidie?
- C'è un nesso tra la divergenza ecologica e le barriere riproduttive?

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 *Anacamptis pyramidalis*

Anacamptis pyramidalis (L.) Rich. 1817 è una specie delle Orchidaceae, ha distribuzione eurimediterranea ([13]) e cresce dal livello del mare fino a oltre 1000 m d'altitudine in prati magri, pascoli, radure e margini boschivi su suoli calcarei ([72], [73]). Si tratta di una geofita bulbosa con foglie basali, acute, fino a 15 cm, verde tenero; la vistosa infiorescenza può raggiungere i 60 cm d'altezza, e porta numerosi fiori rosa-porporini (ma esistono anche esemplari a fiori bianchi) che si aprono da fine Aprile ad inizio Luglio a partire da quelli inferiori, conferendo alle giovani infiorescenze un aspetto piramidale, da cui l'epiteto specifico. I fiori misurano circa un centimetro, presentano un ampio labello con tre lobi fra loro simili e due carene in prossimità dell'imboccatura dello sperone. I petali sono tra loro divergenti e rivolti all'indietro, mentre i sepali concorrono a formare una sorta di lasso elmetto sopra il ginostemio. Quest'ultimo contiene due *pollinaria* le cui caudicole sono unite a "V" in un unico retinacolo (o viscidio), sporgente nella cavità della fauce dello sperone, mentre gli stigmi sono biancastri e molto vischiosi. Lo sperone, privo di nettare, è sottile e lungo almeno quanto l'ovario, si proietta all'indietro e verso il basso. Gli impollinatori sono principalmente farfalle diurne (*Zygaena*, [34]) e la specie non è mai autogama. Il frutto è una capsula contenente migliaia di piccolissimi semi.

2.2 Siti di studio

Sebbene *A. pyramidalis* sia presente e relativamente comune anche in altre aree dei Colli Berici, il presente lavoro di tesi si è concentrato su due stazioni in particolare: Cà Lombarda, comune di Grancona (VI), N 45.426320 E 11.444065; Monte Roccolo, comune di Sarego (VI), N 45.406252 E 11.436035. Le due località presen-

tano sia piante tetraploidi sia piante diploidi, distribuite in un'area accessibile.

Il periodo di studio ha compreso le stagioni di fioritura 2013 e 2014 (da Maggio a Luglio). In particolare, nel 2013 sono stati raccolti i dati preliminari, mentre nel 2014 sono stati raccolti la maggioranza dei dati sperimentali.

2.3 Morfometria florale

È stato raccolto un fiore per pianta da 121 individui etichettati nelle stazioni di Cà Lombarda e Monte Roccolo. I fiori sono stati tagliati alla base dell'ovario e posti in una eppendorf da 1.5 ml con etanolo 90° a 4° C.

2.3.1 Misura tratti floreali

Con questo scopo ogni singolo fiore è stato sezionato nelle singole parti floreali. Queste sono state poi disposte tra due vetrini portaoggetto e poste su uno scanner per l'acquisizione delle immagini. Una volta digitalizzata l'immagine, la misurazione dei singoli caratteri floreali è stata effettuata utilizzando il software ImageJ ([67]).

Per ogni fiore sono stati misurati 19 tratti floreali visibili in figura 2.1:

X.Sp.Ap: larghezza dello sperone all'apice

X.Sp.Met: larghezza dello sperone a metà della sua lunghezza

X.Sp.Fauc: larghezza dello sperone alla fauce (all'imboccatura)

Y.Sp: lunghezza dello sperone (dalla fauce alla punta)

X.Lab.Max: larghezza massima labello

X.LobLat: distanza lobi laterali

Y.Lab: lunghezza labello

X.LobMed: larghezza lobo medio labello

Y.LobMed: lunghezza lobo medio labello

X.SepSx: larghezza sepalo sinistro

Y.SepSx: lunghezza sepalo sinistro

X.SepDx: larghezza sepalo destro

Y.SepDx: lunghezza sepalo destro

X.SepCen: larghezza sepalo centrale

Y.SepCen: lunghezza sepalo centrale

X.PetSx: larghezza petalo sinistro

Y_PetSx: lunghezza petalo sinistro

X_PetDx: larghezza petalo destro

Y_PetDx: lunghezza petalo destro

Tutte le misure sono state espresse in centimetri.

2.3.2 Analisi statistica

Per ogni ploidia è stata calcolata media e deviazione standard di tutti i tratti fiorali misurati. I dati sono stati quindi importati in R

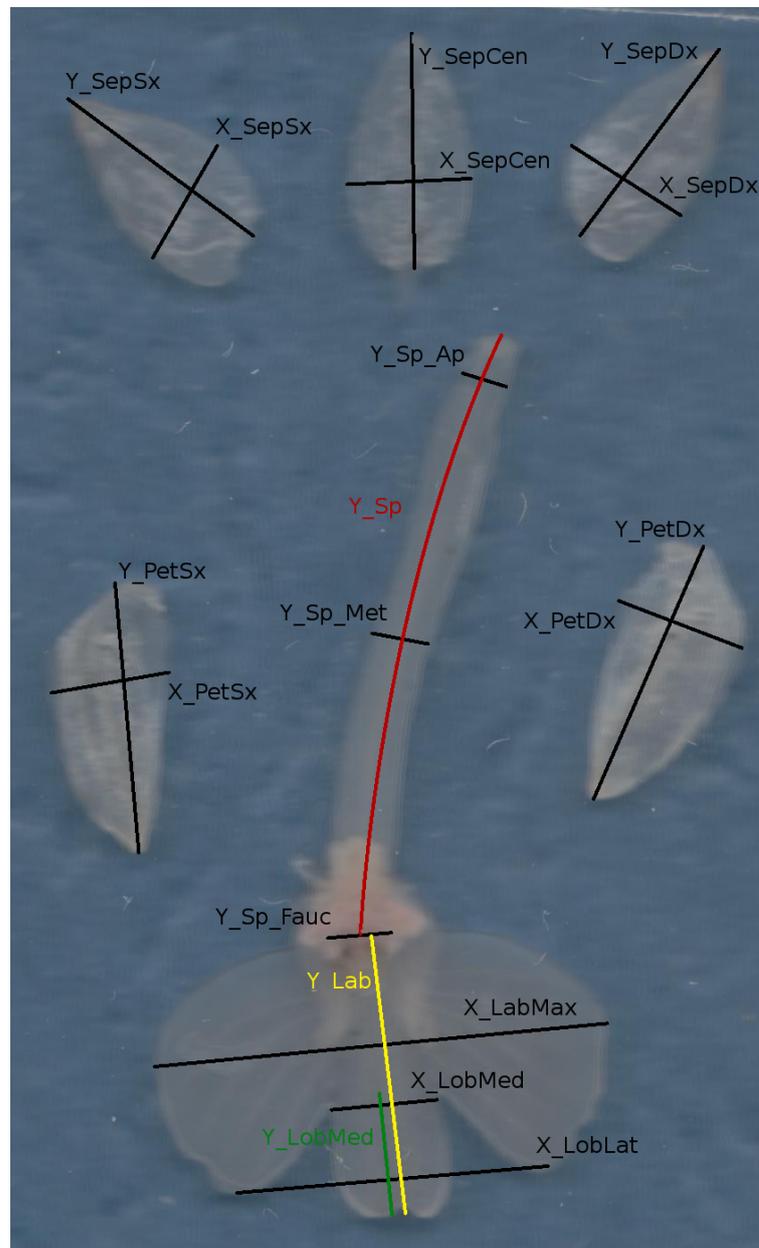


Figura 2.1: Schema della misurazione dei tratti fiorali.

([69], [?]) e con un Mann-Whitney U-Test si è valutato se ci fossero differenze statisticamente significative tra le due ploidie.

È stata quindi effettuata un'Analisi dei Componenti Principali (PCA) e le prime due componenti (in ordine di percentuale di varianza spiegata) sono state riportate in grafico per esprimere visivamente il grado di separazione morfologica tra le ploidie.

2.4 Colorazione del labello

Durante il rispettivo periodo di massima fioritura, sono stati raccolti 30 fiori da altrettanti individui tetraploidi e 30 fiori da altrettanti individui diploidi. I fiori sono stati tagliati alla base dell'ovario (senza intaccare lo sperone), messi in provette Falcon da 25 ml e spediti ai laboratori dell'Università Federico II di Napoli, dove è stata condotta l'analisi.

La misurazione della colorazione dei fiori di individui tetraploidi e diploidi è stata effettuata tramite uno spettrofotometro Ocean Optics S2000 e sorgente lunimosa OceanOpticsDT 200-1100 nm (Dunedin, Florida, USA), che misura la riflettanza della luce sulla superficie del fiore, effettuando tre misurazioni per ogni labello attraverso una sonda a fibra ottica (UV/VIS 400 lm) posta a 5 mm dalla superficie del labello stesso.

2.5 Altezza e numero di fiori

Per le piante etichettate è stata misurata anche l'altezza (all'apertura del primo fiore) dalla rosetta basale all'apice dell'infiorescenza ed il numero di fiori totale (quest'ultimo ottenuto dai dati fenologici).

2.6 Fitness

È stato utilizzato il fruit set (n° di frutti / n° di fiori totali) come stima prossima del successo riproduttivo dei diversi citotipi di *A. pyramidalis* ([19]).

Verso la fine della fioritura di ciascuna entità (cioè metà Giugno per i tetraploidi ed i triploidi, e fine Giugno per i diploidi), sono stati contati, in 146 piante precedentemente etichettate per l'analisi fenologica (per avere la certezza di ascriverle ognuna al citotipo corretto), il numero di frutti (ovari ingrossati) ed il numero di fiori totali. Per quest'ultimo è stato creato un consenso tra il numero di fiori rilevato a pianta sfiorita ed il numero medio di fiori contati per quella pianta nei conteggi fenologici.

2.7 Correlazione tratti morfologici e fruit set

È stato calcolato con R ([69]) il coefficiente di correlazione di Spearman (ρ) e relativo indice di confidenza statistica (p-value) tra il fruit set e le misurazioni morfologiche, producendo una matrice di correlazione per ciascuno dei citotipi tetraploide e diploide.

2.8 Fenologia

A partire dai primi giorni di Maggio, è stato monitorato ogni 3 giorni il periodo di fioritura (modificato da [29]).

Sono stati etichettati con del nastro isolante colorato ed è stato assegnato un identificativo a 69 individui tetraploidi, 94 individui diploidi e 15 individui presunti triploidi. Di ciascuna di queste piante, ogni 3 giorni è stato contato il numero di boccioli, fiori aperti e fiori sfioriti, in modo da poter ricavare il numero medio di fiori per pianta e stimare con precisione il numero totale di fiori aperti in un dato giorno ([22]).

2.8.1 Isolamento fenologico

È possibile tener conto dell'asincronia delle fioriture considerando per ogni giorno di sovrapposizione la proporzione di fiori aperti che erano tetraploidi o che erano diploidi, pesandoli per la relativa proporzione rispetto al totale di fiori tetraploidi o diploidi della stagione e sommandoli poi per tutti i giorni.

È necessario conoscere il numero totale di fiori aperti di ogni ploidia ad un dato giorno per ricavare tale quantità. In Cà Lombarda non è stato possibile contare direttamente tutte le tetraploidi, essendo troppo numerose. È stata perciò calcolata la densità media nelle zone dove sono state campionate le piante per l'analisi spaziale. Utilizzando Google Earth ([66]), è stato tracciata sulla foto satellitare l'area occupata dalla popolazione di tetraploidi, esportata l'immagine e misurata con ImageJ ([67]), ottenendone la superficie. È sufficiente moltiplicare la superficie occupata dalle tetraploidi per la densità media per ottenere il numero di individui tetraploidi totali nella stazione.

Per avere il numero totale di fiori di ciascuna ploidia ad un dato giorno si divide il numero di fiori aperti osservato per la proporzione di individui analizzati rispetto al numero totale nella stazione (n° individui analizzati / n° individui totali stazione).

Si può ricavare la proporzione effettiva di fiori delle due ploidie aperti ad un dato giorno esprimendo come percentuale il numero

di fiori di tetraploidi o diploidi rispetto al totale di fiori. Questo dato perciò rappresenta la percentuale di fiori disponibili all'impollinazione incrociata ad un dato giorno. È possibile ricavare la proporzione di fiori aperti nel periodo di sovrapposizione rispetto al totale di fiori prodotti nell'arco della stagione, ovvero la proporzione cumulativa totale di fiori disponibili all'impollinazione incrociata, sommando il numero totale di fiori aperti durante la sovrapposizione e dividendo per il numero totali di fiori prodotti.

2.9 Struttura spaziale delle popolazioni

Per valutare quanto la distribuzione nello spazio incida sull'isolamento riproduttivo delle due entità, è stato analizzato nel dettaglio come tetraploidi e diploidi sono distribuiti nelle due stazioni di studio.

2.9.1 Mappatura

Sono state selezionate delle zone rappresentative all'interno delle stazioni, e creato un transetto all'interno delle popolazioni di *A. pyramidalis* stendendo una corda con un nodo ogni metro come riferimento. Con un navigatore satellitare è stata registrata la coordinata geografica del punto di inizio del transetto e quella di fine transetto, annotando anche la distanza tra suddetti punti.

A questo punto con un metro a nastro (o da falegname) sono state misurate per ogni pianta una coordinata x (in metri), che rappresenta la distanza dall'inizio del transetto alla proiezione ortogonale di quella pianta sul transetto stesso, ed una coordinata y (in metri), che è la distanza perpendicolare di quella stessa pianta dal transetto. Per ogni individuo mappato è stato annotata anche la ploidia stimata su base morfologica.

2.9.2 Conversione coordinate

La coppia di coordinate relative così ottenuta è stata convertita in coordinate geografiche, per poter assemblare i dati provenienti dai vari transetti. Per far ciò è stato utilizzato il software Google Earth ([66]).

Avvalendosi del fatto che foto satellitari per l'area dei Colli Berici presenti in Google Earth sono state scattate recentemente (Marzo 2014), e sapendo che il navigatore satellitare non garantisce una precisione elevata (anche a causa di interferenze e copertura nuvolosa), la coordinata geografica rilevata in campo è stata "corretta"

sulla mappa fornita da Google Earth, creando un consenso tra il dato rilevato col navigatore e quello fornito dalla foto satellitare.

Tali coppie (latitudine e longitudine) di “coordinate consenso” di inizio ($P_{i,Lat}$, $P_{i,Long}$) e fine ($P_{f,Lat}$, $P_{f,Long}$) di ciascun transetto sono state inserite nel software, creando una linea sulla mappa che rappresenta il transetto stesso. È stata poi creata un’altra linea ortogonale a questa, con un estremo in P_i e l’altro estremo, detto P_{\perp} , ad una coordinata nota ($P_{\perp,Lat}$, $P_{\perp,Long}$). Utilizzando lo strumento di misurazione compreso nel software si ricava la distanza in metri $\overline{P_i P_{\perp}}$.

La conversione della coordinata relativa (i dati grezzi di distanza rispetto al transetto) in coordinata geografica assoluta (latitudine e longitudine) prevede due passaggi successivi. Utilizzando un foglio di calcolo elettronico ([68]) è stata calcolata una coordinata intermedia, la cui utilità è meramente il calcolo della coordinata geografica finale. Si definiscono le due quantità

$$CoordInt_{Lat} = P_{i,Lat} + \frac{P_{i,Lat} - P_{f,Lat}}{\overline{P_i P_f}} \cdot x$$

$$CoordInt_{Long} = P_{i,Long} + \frac{P_{i,Long} - P_{f,Long}}{\overline{P_i P_f}} \cdot x$$

dove x è la coordinata x della pianta (ovvero la proiezione sul transetto).

È possibile a questo punto ricavare la coordinata geografica definitiva con le seguenti formule:

$$CoordDef_{Lat} = CoordInt_{Lat} + \frac{P_{i,Lat} - P_{\perp,Lat}}{\overline{P_i P_{\perp}}} \cdot y$$

$$CoordDef_{Long} = CoordInt_{Long} + \frac{P_{i,Long} - P_{\perp,Long}}{\overline{P_i P_{\perp}}} \cdot y$$

dove y è la coordinata y della pianta (ovvero la distanza dal transetto).

Queste operazioni sono state ripetute per ogni pianta mappata, in modo da ottenere per ciascuna una coppia di coordinate geografiche (es.: N 45.0000 E 11.0000), che possono essere riportate in grafico per visualizzare la distribuzione all’interno della stazione delle piante delle diverse ploidie.

2.9.3 Stima della probabilità di impollinazione incrociata in base alla distribuzione dei citotipi

La preferenza di nicchia potrebbe limitare l’interscambio tra le ploidie. Per valutare questo meccanismo d’isolamento estrinseco i dati

della distribuzione spaziale sono stati suddivisi in quadranti (bin) di 30·30 m. Tale dimensione è stata basata sulla distanza media (30 m) di volo di un impollinatore di *A. pyramidalis* ([25]), *Zygaena*.

L'area di ciascuna delle stazioni è stata divisa in bin e la presenza di una o di entrambe le ploidie riportata in un istogramma bidimensionale (heatmap), che riporta le coordinate geografiche in ascissa ed ordinata ed il numero di piante sull'asse z.

Sono stati contati i bin entro cui erano presenti entrambe le ploidie ed il numero di bin in cui ce n'era almeno una, e calcolata la percentuale di sovrapposizione.

Essendo la ripartizione in quadranti arbitraria, sono state eseguite 900 permutazioni spostando di volta in volta la griglia di riferimento dei bin di 1 m in latitudine o in longitudine per uno spostamento totale di 30 metri in entrambe le direzioni (equivalente a 0,000280 in latitudine e 0.000395 in longitudine). Si considerano in tal modo tutte le possibili ripartizioni dello spazio, ed è stato quindi calcolato il valore medio di sovrapposizione.

2.10 Citometria di flusso

Per un sottoinsieme delle piante etichettate è stata stimata la corretta ploidia di ogni individuo. Da ciascuna sono stati raccolti almeno 10 *pollinaria*, prelevandoli con una pinzetta da microscopia e riponendoli in una eppendorf da 1.5 ml. Il polline così raccolto è stato conservato in frigorifero (a circa 4°C) e successivamente inviato presso i laboratori dell'Università Federico II di Napoli per le analisi al citofluorimetro di flusso.

Le massule polliniche sono state separate dal viscidio sospendendole in 1 ml di buffer per l'isolamento dei nuclei ([18], [39]). La soluzione è stata incubata per 2 min su ghiaccio e successivamente i pollinodi sono stati frammentati con un bisturi. Le cellule sono state filtrate a 30 micron e trattate con una soluzione colorante (1mg/ml RNAsi e 50 µg/ml di bromuro di propidio) per 2 ore a temperatura ambiente. L'analisi del DNA in citometria a flusso è stata eseguita utilizzando l'apparecchio FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) che monta un laser a ioni di Argon raffreddato ad acqua (488nm, 150mW), software Cell Quest (Becton Dickinson) ed associato ad un modulo di discriminazione dei doppietti.

In questo modo si è confermato che le differenze morfologiche avevano una corrispondenza con il grado di ploidia delle piante esaminate.

2.11 Pollen transfer

Per valutare se sussistono delle differenti preferenze da parte degli impollinatori sono stati allestiti dei plot sperimentali (secondo [64]) per determinare come gli impollinatori trasferiscono il polline tra fiori diversi nelle stesse condizioni ambientali.

La tecnica del pollen staining è preferibile all'osservazione diretta del comportamento degli impollinatori ([22], [16]) per *A. pyramidalis*, in quanto, come in altre Orchidee prive di nettare ([48]), l'osservazione diretta degli impollinatori è piuttosto difficile ed infrequente.

2.11.1 Allestimento plot sperimentali

Sono stati allestiti 3 plot in data 04/06/14 ed altri 3 plot in data 12/06/14, presso la stazione di Cà Lombarda, scelta come sito dell'esperimento in quanto ospita popolazioni di *A. pyramidalis* e può vantare una notevole abbondanza e diversità di insetti impollinatori.

Ogni plot è stato distanziato dagli altri di almeno 5 m, ed il posizionamento all'interno della stazione è stato scelto in base all'attività dei pronubi, specialmente Lepidotteri, nei giorni interessati. Ciascun plot conteneva 2 infiorescenze diploidi e 2 infiorescenze tetraploidi, alternate, poste ognuna con dell'acqua in una provetta Falcon da 15 ml conficcata nel terreno e posizionate ai vertici di un quadrato di 25 cm di lato.

Questi plot sperimentali sono stati allestiti durante il periodo di sovrapposizione fenologica delle due entità tetraploide e diploide, che si trovano rispettivamente alla fine ed all'inizio della fioritura nei primi giorni di Giugno.

2.11.2 Colorazione del polline

Gli scapi fiorali sono stati recisi alla base e posti immediatamente in acqua. La colorazione delle massule polliniche è stata fatta seguendo [64] e [37]: i *pollinaria* dei fiori di tetraploidi sono stati colorati con una soluzione acquosa di blu di metilene 1% p/v + 2 μ l di SilWet, quelli dei fiori diploidi con una soluzione acquosa di rosso neutro 1% p/v + 2 μ l di SilWet. L'aggiunta del detergente SilWet aiuta ad abbassare la tensione superficiale della soluzione rendendo più facile la colorazione del polline.

Con una siringa Hamilton da 25 μ l, una piccolissima goccia di soluzione colorante è stata posta sulle masse polliniche, ancora all'interno delle logge che le ospitano, prestando attenzione a non

macchiare altre parti del fiore. Dalle infiorescenze sono stati eliminati i fiori sfioriti, mentre i boccioli ed i *pollinaria* eventualmente rimasti non sono stati rimossi.

Per ognuna sono stati colorati tanti fiori quanti quelli colorati nell'infiorescenza meno numerosa di quel plot, quindi tutte le infiorescenze dello stesso plot avevano lo stesso numero di fiori colorati. Il colorante è stato lasciato diffondere durante la notte ed il mattino seguente sono stati allestiti i plot. Dopo 48-72h di esposizione agli impollinatori, le infiorescenze sono state recuperate (prima che si deteriorassero troppo) e sono state esaminate allo stereoscopio per determinare la presenza di polline colorato sugli stigmi. Sono stati ignorati granuli di polline di altre specie o massule polliniche di *A. pyramidalis* non marcate.

2.12 Incroci e vitalità dei semi

Dato che spesso l'incrocio tra due citotipi differenti è svantaggioso in termini di fitness nelle piante ([42]), è stata valutata la differenza, in termini di fruit set e percentuale di semi contenenti un embrione, in incroci manuali intra ed interploidia.

2.12.1 Impollinazioni manuali

Gli incroci sono stati eseguiti seguendo le indicazioni in [48]: sono stati selezionati nella stazione di Cà Lombarda 10 individui tetraploidi e 10 individui diploidi, e per ciascuno di essi prelevato il polline, che è stato conservato a 4°C fino all'utilizzo. Per ogni pianta sono stati impollinati 3 fiori con polline omoploide (incroci $4n \times 4n$; $2n \times 2n$) e 3 fiori con polline eteroploide (incroci $4n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$; $2n_{\text{♀}} \times 4n_{\text{♂}}$); in totale sono stati impollinati 30 fiori per ogni tipologia d'incrocio.

Sono stati prelevati con le pinzette i pollinodi precedentemente raccolti, e sono state fatte aderire le massule di polline agli stigmi vischiosi, controllando poi la presenza di granuli (e quindi l'avvenuta impollinazione) con una lente d'ingrandimento 10x. Per identificare i fiori impollinati manualmente, è stato legato alla base dell'ovario un filo di cotone colorato: arancione per gli incroci $4n \times 4n$; rosso per $2n \times 2n$; blu per gli incroci interploidia $4n_{\text{♀}} \times 2n_{\text{♂}}$; $2n_{\text{♀}} \times 4n_{\text{♂}}$.

Dato il notevole tempo richiesto per l'operazione, l'impollinazione manuale è stata fatta nell'arco di più giorni consecutivi, prestando però attenzione a portare a termine l'impollinazione di una stessa pianta nello stesso giorno (per evitare una differente allocazione delle risorse destinate alla fruttificazione in tempi differenti).

2.12.2 Vitalità dei semi

Tra il 27/06/14 ed il 07/07/14 sono stati raccolti tutti i frutti risultanti dalle impollinazioni manuali, appena maturi ma prima che si aprissero per disperdere i semi. Le capsule (frutti) sono state posizionate ognuna in un'eppendorf con l'identificativo della pianta di provenienza e conservate, con le provette aperte, in un locale secco a temperatura ambiente.

Per ogni capsula sono stati quindi estratti i semi. Questi sono stati disposti su di un vetrino portaoggetto asciutto, coperti con un vetrino coprioggetto 20*14mm (per evitare l'attrazione elettrostatica dell'obiettivo) ed osservati a 100 ingrandimenti per determinare la percentuale di semi contenenti un embrione

Al fine di ottenere un conteggio corretto, si ispeziona l'estensione del vetrino coprioggetto con movimento in senso verticale, ed una volta raggiunto il margine di questo, si sposta orizzontalmente (e sempre nello stesso verso) la visuale della larghezza del reticolo sull'oculare, per ripetere poi il movimento in senso verticale. Seguendo questo percorso, contando solo i semi che ricadono entro il reticolo (ad ogni movimento verticale) si ha la garanzia di non contare più volte lo stesso seme e di esaminare accuratamente tutto il vetrino.

Per ogni capsula è stato annotata la pianta di provenienza, il numero di semi vuoti ed il numero di semi con embrione, fino alla concorrenza di circa 500 semi totali (n° vuoti + n° embrionati) o fino ad esaurimento dei semi disponibili.

2.13 Indici di isolamento riproduttivo

Al fine di valutare il livello di isolamento riproduttivo fra tetraploidi e diploidi di *A. pyramidalis* sono stati calcolati degli indici relativi a ciascuna barriera riproduttiva esaminata.

2.13.1 $RI_{PHENOLOGY}$

In assenza di barriere pre-zigotiche, la probabilità di incrocio interploidia dipenderà soltanto dalla proporzione di fiori eteroploidi aperti nel corso della stagione rispetto ai fiori omoploidi ([29]).

La riduzione del flusso genico dovuta solamente all'asincronia delle fioriture è data da (secondo [29]):

$$RI_{PHENOLOGY} = 1 - \frac{q_{1.4n}/q_{0.4n}}{(1 - q_{1.4n})/(1 - q_{0.4n})}$$

con $q_{1.4n} = \sum_i q_{1.4n,i} \cdot p_{1.4n,i}$, dove $q_{0.4n}$ è la proporzione dei fiori della stagione che sono tetraploidi; $q_{1.4n,i}$ è la proporzione di fiori aperti

al giorno i che sono tetraploidi e $p_{1,4n,i}$ proporzione dei fiori totali prodotti (nella stagione) aperti al giorno i .

Si ottiene l'analogo indice per i diploidi con le debite sostituzioni. Si può calcolare l'isolamento medio dovuto alla fenologia mediando gli indici di tetraploidi e diploidi.

2.13.2 $RI_{\text{MICROHABITAT}}$

È possibile calcolare questo indice di isolamento spaziale come (da [50]):

$$RI_{\text{MICROHABITAT}} = 1 - \frac{\text{n° di bin con entrambe le ploidie}}{\text{n° di bin con almeno una ploidia}}$$

Questa è la probabilità che due piante di ploidia diversa si trovino ad una distanza uguale o inferiore alla distanza utile all'impollinazione percorribile da un pronubo, ed è quindi una misura dell'isolamento pre-impollinazione dovuto alla distribuzione nello spazio degli individui.

2.13.3 $RI_{\text{PRE-POLL}}$

La proporzione di scambi di polline interploidia confrontata con quella intraploidia è una misura dell'isolamento riproduttivo dovuto alla preferenza degli impollinatori, e si ottiene il relativo indice di isolamento riproduttivo con la formula (tratta da [50]):

$$RI_{\text{PRE-POLL}} = 1 - \frac{\text{proporzione impollinazioni interploidia}}{\text{proporzione impollinazioni intraploidia}}$$

2.13.4 $RI_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}}$

Sapendo che nelle Orchidee lo sviluppo del gametofito, ed il conseguente l'ingrossamento dell'ovario, segue la deposizione di polline sugli stigmi e precede la formazione dello zigote ([65]), è possibile calcolare un indice di isolamento riproduttivo post-impollinazione pre-zigotico (da [48]):

$$RI_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}} = 1 - \frac{\text{fruit set incroci interploidia}}{\text{fruit set incroci intraploidia}}$$

2.13.5 RI_{EMBRYO}

È possibile ricavare un indice di isolamento post-zigotico precoce dovuto alla mortalità degli embrioni con la seguente formula (da [48]):

$$RI_{\text{EMBRYO}} = 1 - \frac{\text{proporzione embrioni vitali incroci interploidia}}{\text{proporzione embrioni vitali incroci intraploidia}}$$

2.13.6 RI_{HYBRID}

Individui ibridi nella popolazione potrebbero agire come ponte genico tra i citotipi parentali. Si valuta il successo riproduttivo degli ibridi rispetto ai parentali calcolando:

$$RI_{HYBRID} = 1 - \frac{\text{fruit set ibrido}}{\text{fruit set parentale}}$$

Questo indice rappresenta la capacità dell'ibrido di attrarre gli impollinatori, un meccanismo di isolamento post-zigotico estrinseco ([50]).

2.13.7 T: isolamento complessivo

Per calcolare l'isolamento riproduttivo cumulativo tra le due entità è necessario considerare le varie barriere nell'ordine in cui agiscono nell'eliminare il flusso genico ([41]).

Si attribuisce un contributo assoluto (AC) ad ogni indice di isolamento: $AC_n = RI_n(1 - \sum_{i=1}^{n-1} AC_i)$, in cui n è l'ordine di successione delle barriere riproduttive. L'isolamento totale, compreso tra zero ed uno è quindi: $T = \sum_{i=1}^m AC_i$, dove m è il numero di barriere in esame. Infine, il contributo relativo (RC) di ciascuna barriera all'isolamento complessivo si ottiene da: $RC_n = AC_n/T$

Capitolo 3

Risultati

3.1 Morfometria florale

Per l'analisi morfometrica dei tratti floreali sono stati utilizzati 58 fiori di piante tetraploidi, 57 fiori di piante diploidi e 6 di presunti individui triploidi, per un totale di 121 fiori dai due siti di studio (Cà Lombarda: 112 campioni; Monte Roccolo: 7 campioni).

3.1.1 Misura tratti floreali

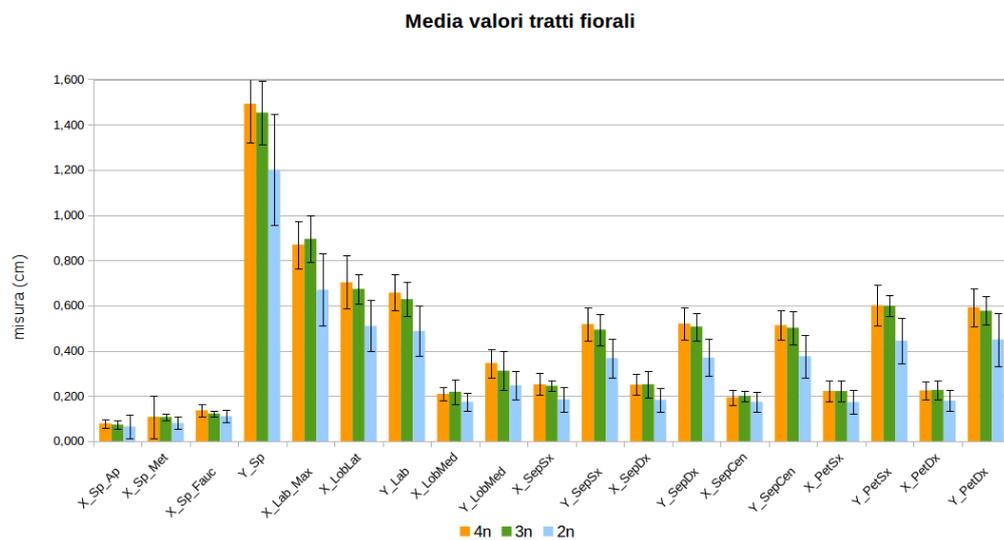


Figura 3.1: Confronto delle dimensioni dei tratti floreali di tetraploidi, triploidi e diploidi.

La figura 3.1 riporta i valori medi con relativa deviazione standard dei 19 tratti floreali misurati. Si osserva che, per la maggioranza dei tratti floreali, i triploidi mostrano dimensioni dei tratti intermedie tra i citotipi parentali.

Nella tabella 3.1 sono riportate le differenze in mm ed in percentuale (rispetto ai tetraploidi) fra i tratti floreali di tetraploidi e diploidi. I valori che presentano una differenza statistica significativa sono contrassegnati con un asterisco: (*= $p\text{-value} \leq 0.05$).

Tabella 3.1: Differenze delle misure dei tratti floreali di tetraploidi e diploidi, in mm e % rispetto ai tetraploidi.

	Δ rispetto al 4n (mm)	$\Delta\%$ rispetto al 4n
X_Sp_Ap	0.136	17.39
X_Sp_Met	0.272*	25.34*
X_Sp_Fauc	0.256	18.77
Y_Sp	2.912	19.51
X_Lab_Max	1.995	22.95
X_LobLat	1.929	27.46
Y_Lab	1.694	25.79
X_LobMed	0.345*	16.53*
Y_LobMed	0.989	28.61
X_SepSx	0.670*	26.63*
Y_SepSx	1.500*	28.97*
X_SepDx	0.670*	26.82*
Y_SepDx	1.503*	28.91*
X_SepCen	0.198	10.20
Y_SepCen	1.375	26.80
X_PetSx	0.482	21.78
Y_PetSx	1.564	26.02
X_PetDx	0.451	20.11
Y_PetDx	1.420**	23.99**

Il $\Delta\%$ rispetto ai tetraploidi va dal 10% al 28% circa, con una media di $23.3\% \pm 5\%$. Ciò significa che i fiori dei tetraploidi sono in media il 23.3% più grandi di quelli dei diploidi; va però evidenziato che le differenze fra i vari tratti non sono omogenee.

3.1.2 Analisi statistica

Mediante Analisi dei Componenti Principali (PCA) vengono identificate (rispetto ai 19 tratti analizzati) un numero minore di componenti che inglobano porzioni diverse della variabilità dei dati.

La figura 3.2 riporta la proporzione di variabilità spiegata da ogni componente. Il primo componente ne incorpora l'89.18%, il secondo il 3.33%, il terzo 1.6%, il quarto 1.27%, ed il quinto 1.03%. Le prime due componenti, che spiegano circa il 93% della variabilità, sono state plottate in grafico, riportato in figura 3.3

È evidente che i due citotipi si differenziano soprattutto per la prima componente, segno della divergenza nei tratti floreali fra piante tetraploidi e diploidi.

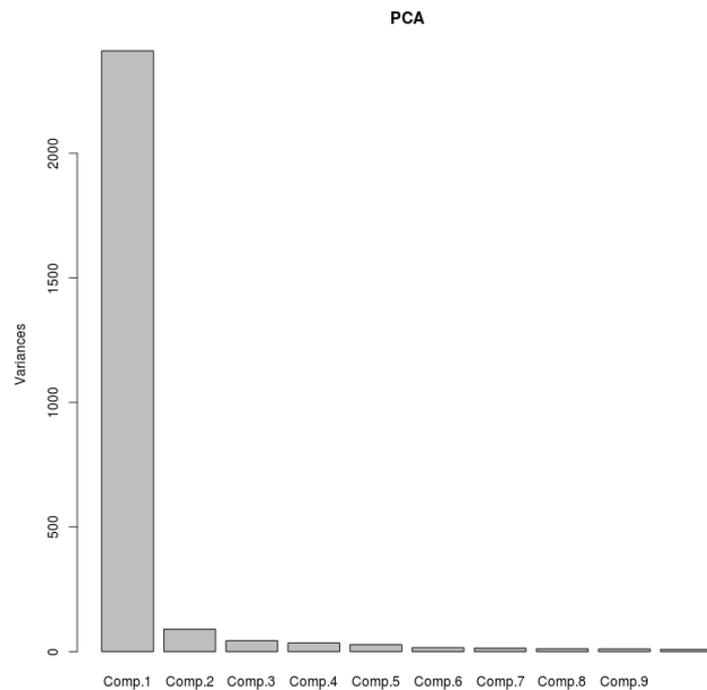


Figura 3.2: Varianza spiegata dai componenti della PCA.

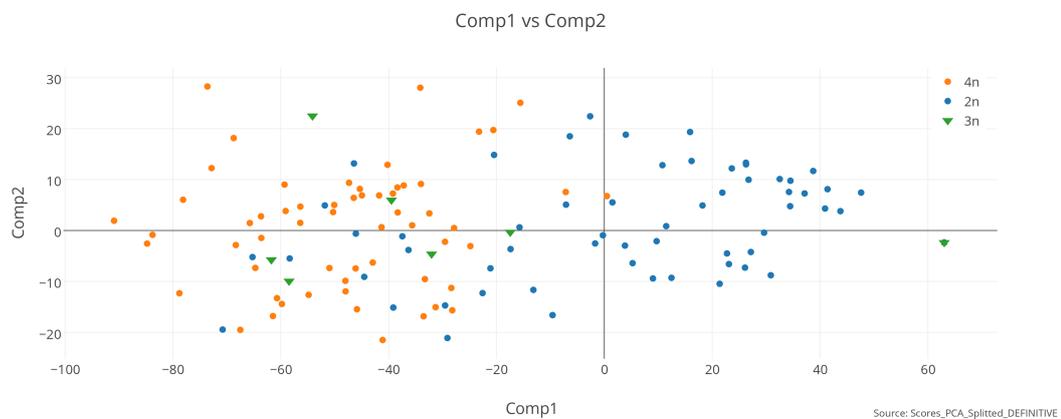


Figura 3.3: Distribuzione delle prime due componenti della PCA di tetraploidi, triploidi e diploidi.

3.2 Colorazione del labello

L'esame della riflettanza del labello ha rivelato differenze significative, riscontrabili anche ad occhio nudo, tra la colorazione dei fiori di tetraploidi e di diploidi. *A. pyramidalis* tetraploide produce solitamente fiori rosa-porporini, mentre i diploidi producono fiori rosa pallido.

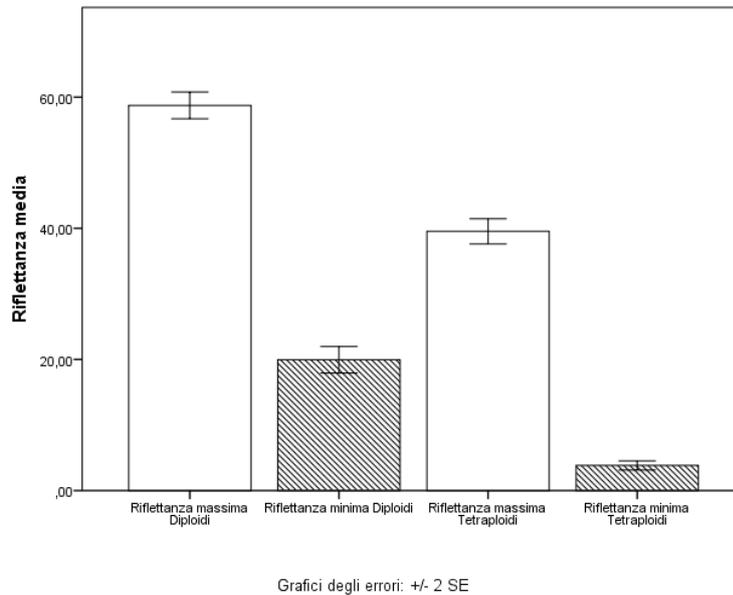


Figura 3.4: Riflettanza media massima e minima del labello di tetraploidi e diploidi.

La figura 3.4 illustra la riflettanza media massima e minima del labello di tetraploidi e diploidi. Le differenze sono significative (ANOVA univariata seguita da un test di Turkey), $p\text{-value} < 0.05$.

3.3 Altezza e numero di fiori

La differenza di altezza dell'infiorescenza ed il numero di fiori sono due tratti maggiormente discriminanti le due ploidie in campo. L'altezza media dei tetraploidi è 24.52 ± 7.30 cm (69 individui), mentre quella dei diploidi è 34.61 ± 9.82 cm (90 individui). Può accadere che l'altezza cambi nel corso della fioritura, tuttavia è stato stimato un aumento massimo del 5% (dati non riportati) in misure successive degli stessi esemplari. Il numero di fiori medio delle piante tetraploidi è 38.05 ± 3.75 , mentre per le piante diploidi è 52.19 ± 5.50 .

3.4 Fitness

Da 148 piante (diploidi e tetraploidi) è stato stimato il successo riproduttivo legato all'impollinazione, inteso come fruit set = (n° frutti / n° di fiori totali per pianta).

Come illustrato in figura 3.5, le piante tetraploidi hanno un fruit set più alto delle diploidi. Si può anche notare che i triploidi hanno un successo riproduttivo intermedio fra i citotipi parentali.

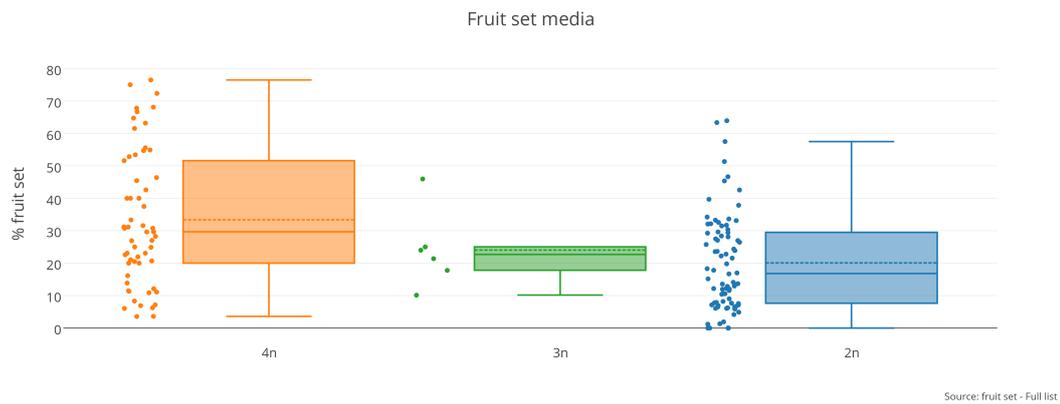


Figura 3.5: Fruit set media di tetraploidi, triploidi e diploidi.

Considerando le due stazioni, mediamente i tetraploidi (60 piante) hanno un fruit set di $33.45 \pm 20.49\%$ mentre le diploidi (81 piante) di $20.28 \pm 14.86\%$.

Tabella 3.2: Confronto del successo riproduttivo di tetraploidi e diploidi per le stagioni 2013 e 2014.

FITNESS 2013		
2n		
n° frutti medio	n° fiori medio	% media fruit set
17.69 ± 19.89	56.38 ± 22.95	28.50 ± 21.72
4n		
n° frutti medio	n° fiori medio	% media fruit set
15.18 ± 9.99	42.20 ± 17.47	33.94 ± 16

FITNESS 2014		
2n		
n° frutti medio	n° fiori medio	% media fruit set
9.39 ± 9.45	48.48 ± 19.23	20.28 ± 14.86
4n		
n° frutti medio	n° fiori medio	% media fruit set
13.52 ± 12.09	38.07 ± 15.07	33.45 ± 20.49

Il maggior successo riproduttivo dei tetraploidi è confermato anche dal confronto con i dati raccolti nel 2013 (tabella 3.2).

3.5 Correlazioni tratti morfologici e fruit set

Nella tabella 3.3 sono indicati i coefficienti di correlazione di Spearman (ρ) tra tratti fiorali ed il fruit set rispettivamente delle piante tetraploidi e diploidi, con il valore di significatività: ***=p-value<0.001; ** =p-value<0.01; * =p-value<0.05.

Tabella 3.3: Coefficienti di correlazione (ρ) tra fruit set, tratti fiorali, altezza e numero di fiori di tetraploidi e diploidi.

4n	fruit set	2n	fruit set
Y_Sp	0.2971052*	Y_Sp	0.4584574***
Y_SepSx	0.3334318*	Y_SepSx	0.1851847
Y_SepDx	0.3883206**	Y_SepDx	0.2216444
Y_SepCen	0.5038256***	Y_SepCen	0.2602746
Y_PetSx	0.3962086**	Y_PetSx	0.3469423*
Y_PetDx	0.4892838***	Y_PetDx	0.3751558**
Y_LobMed	0.2509603	Y_LobMed	0.2305893
Y_Lab	0.5431151***	Y_Lab	0.4410184***
X_Sp_Met	0.299302*	X_Sp_Met	0.4953154***
X_Sp_Fauc	0.2001872	X_Sp_Fauc	0.5925569***
X_Sp_Ap	0.2273683	X_Sp_Ap	0.4119388**
X_SepSx	0.02412652	X_SepSx	0.2878945*
X_SepDx	0.2718123	X_SepDx	0.3192763*
X_SepCen	0.2107439	X_SepCen	0.2308214
X.PetSx	0.1669547	X_PetSx	0.2637825
X_PetDx	0.3196853*	X_PetDx	0.2415525
X_LobMed	0.3222465*	X_LobMed	0.3756712*
X_LobLat	0.3201279*	X_LobLat	0.3739482*
X_Lab_Max	0.544151***	X_Lab_Max	0.4610359***
n° fiori	0.2624677*	n° fiori	0.2034926
Altezza	0.6033113***	Altezza	0.1419774

Ovviamente c'è un'elevata correlazione tra molti dei tratti fiorali, per cui la correlazione di un tratto con il fruit set può anche essere dovuta all'effetto indiretto della correlazione di un altro tratto che covaria con questo. Nel complesso, i vari tratti fiorali correlano tra loro più significativamente nei tetraploidi che nei diploidi (dati riportati in appendice A).

Lunghezza dello sperone, dei petali e lunghezza e larghezza del labello sono significativamente correlati al fruit sia in tetraploidi che in diploidi.

Tra i tratti che mostrano una differente correlazione con il fruit set tra diploidi e tetraploidi vi sono la fauce dello sperone (nelle piante diploidi) e l'altezza della pianta (nelle piante tetraploidi).

3.6 Fenologia

In figura 3.6 è illustrata, per ogni giorno, la percentuale di fiori aperti (rispetto al massimo numero osservato) per tetraploidi e diploidi.

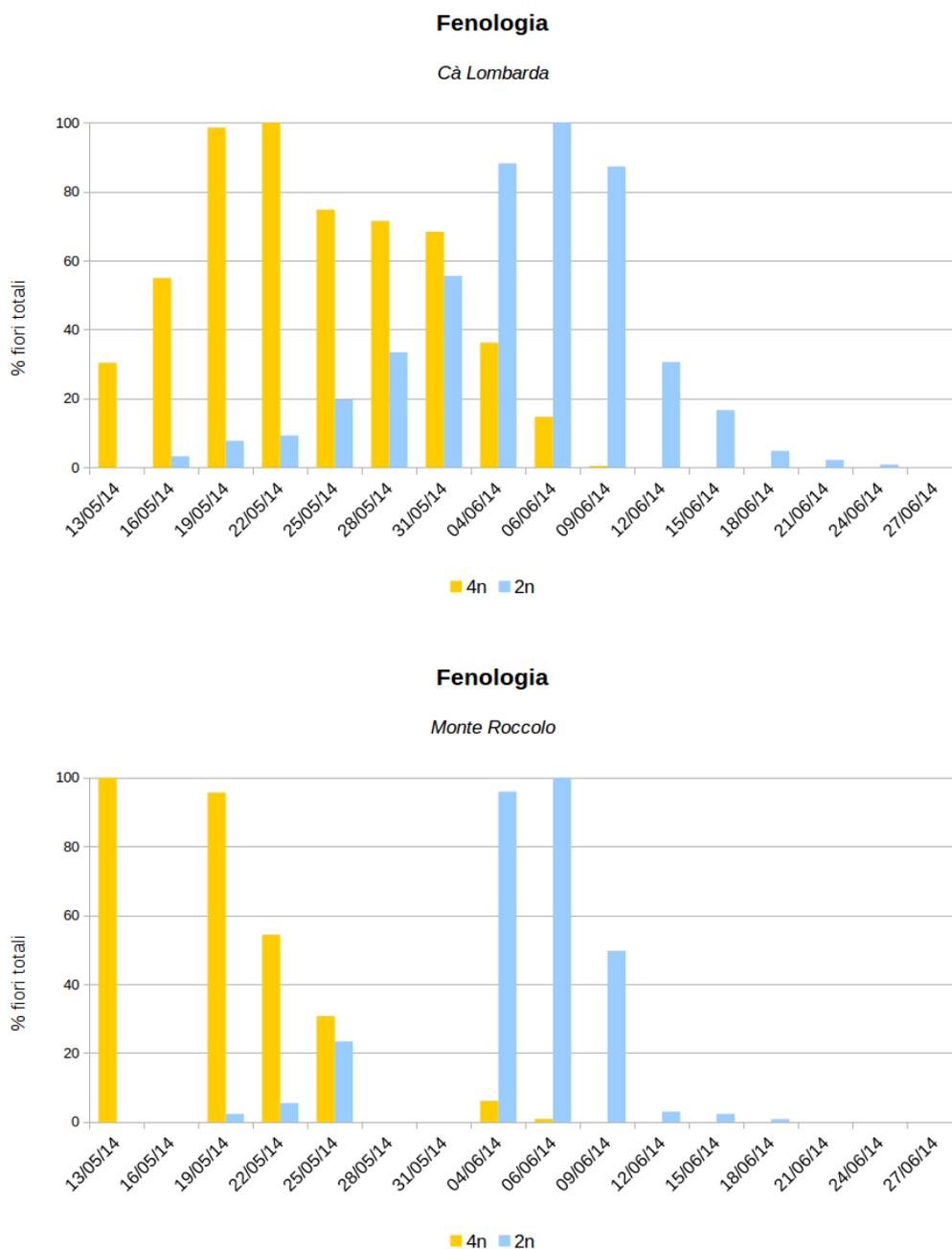


Figura 3.6: Percentuale di fiori aperti di tetraploidi e diploidi rispetto al massimo osservato nelle due stazioni.

Il picco di fioritura occorre nei tetraploidi il 22 Maggio in Cà Lombarda ed il 13 Maggio al Monte Roccolo, mentre nei diploidi occorre il 6 Giugno in entrambe le stazioni.

La data di inizio fioritura dei tetraploidi è stata stimata tramite regressione lineare dei dati fenologici, non essendo stato possibile registrarla direttamente (primo rilievo in campo: 4 Maggio).

La tabella 3.4 riassume le date di inizio, massimo e fine fioritura, insieme al numero totale di giorni di fioritura per ciascuna ploidia.

Tabella 3.4: Date di inizio, massimo e fine fioritura con giorni totali di fioritura per tetraploidi e diploidi nelle due stazioni.

	Cà Lombarda		Monte Roccolo	
	4n	2n	4n	2n
Inizio	30/04-09/05	13-16/05	(04/05)	16-19/05
Massimo	22/05/14	06/06/14	13/05/14	06/06/14
Fine	12/06/14	24/06/14	06/06/14	18/06/14
Giorni totali	38	40	33	32

Nella stazione di Cà Lombarda, tetraploidi e diploidi sono stati in fiore contemporaneamente per 28 giorni, cioè per il 75% del periodo di fioritura dei tetraploidi e per il 70% di quello dei diploidi.

Nella stazione del Monte Roccolo, la sovrapposizione è durata 19 giorni, ovvero il 57% ed il 59% del periodo di fioritura dei tetraploidi e dei diploidi rispettivamente.

3.6.1 Isolamento fenologico

Il calcolo del numero di piante in ogni stazione ha riscontrato un rapporto tetraploidi/diploidi di 37/1 in Cà Lombarda, e dell'1.6/1 al Monte Roccolo.

La figura 3.7 illustra la percentuale di fiori tetraploidi e fiori diploidi aperti per ciascun giorno durante il periodo di sovrapposizione in Cà Lombarda. Il trend è simile anche se non così chiaro al Monte Roccolo (dati non riportati).

Complessivamente per le due stazioni, la percentuale di fiori (rispetto al totale prodotto) aperti durante il periodo di sovrapposizione è stata il 74.24% per i tetraploidi ed il 25.76% per i diploidi.

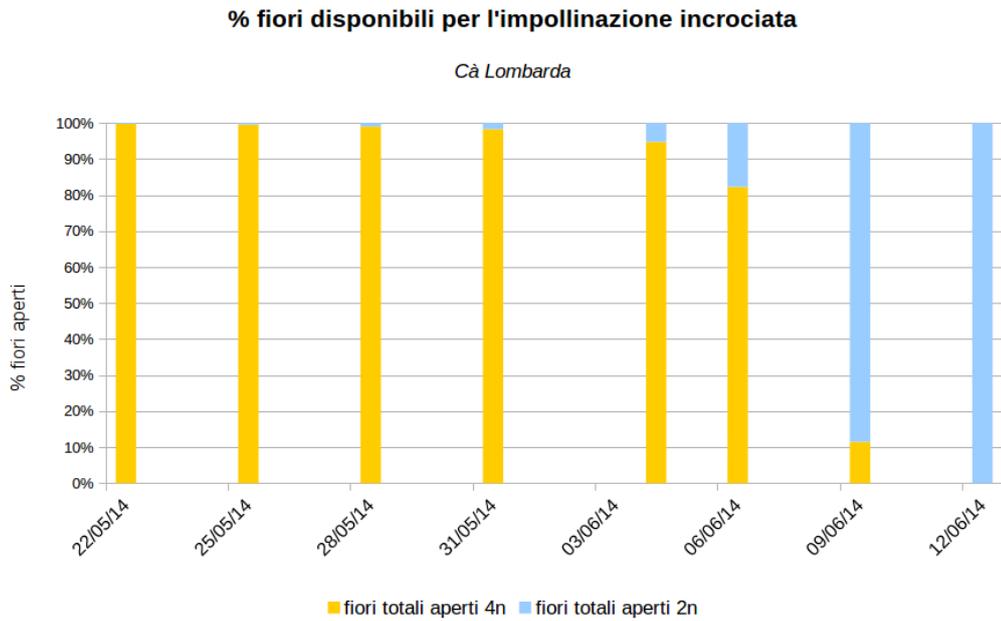


Figura 3.7: Percentuale di fiori di tetraploidi e di diploidi aperti durante la sovrapposizione fenologica.

3.7 Struttura spaziale delle popolazioni

Le figure 3.8 e 3.9 riportano le coordinate geografiche degli esemplari mappati, con latitudine in ascissa e longitudine in ordinata, per le stazioni di Cà Lombarda e Monte Roccolo.

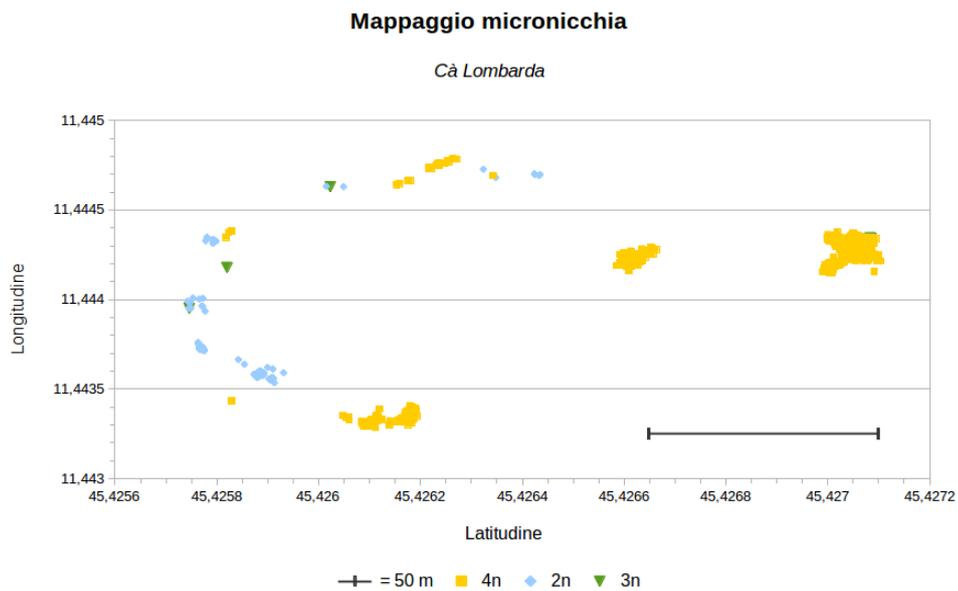


Figura 3.8: Distribuzione degli individui dei diversi citotipi alla stazione di Cà Lombarda.

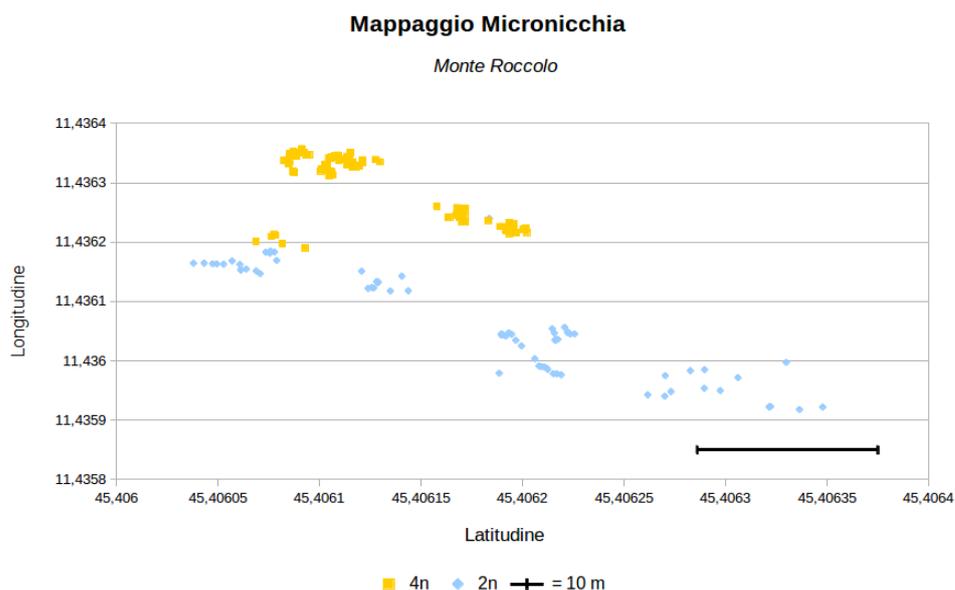


Figura 3.9: Distribuzione degli individui dei diversi citotipi alla stazione del Monte Rocolo.

I grafici rappresentano l'effettiva distribuzione nello spazio degli individui, ed è possibile notare che in entrambi i siti di studio le popolazioni di tetraploidi e diploidi non si distribuiscono casualmente, ma tendono a colonizzare aree diverse le une dalle altre.

3.7.1 Stima della probabilità di impollinazione incrociata in base alla distribuzione dei citotipi

La figura 3.10 mostra la divisione in bin all'inizio ed alla fine del percorso di permutazione dell'area delle due stazioni. I numeri ed i colori di ogni bin rappresentano il numero di piante contenute.

Per il Monte Rocolo risulta una sovrapposizione di 1740 bin su 4680, mentre in Cà Lombarda di 1810 su 10848 bin, con una percentuale di sovrapposizione del 37.18% e 16.68% rispettivamente.

3.8 Citometria di flusso

L'esame in citometria di flusso del contenuto 1-C di DNA, in nuclei isolati da polline, ha fornito valori omogenei all'interno delle singole ploidie. L'analisi ha evidenziato valori medi ben distinti e multipli tra i rispettivi citotipi (figura 3.11):

In particolare nel 97% dei casi il livello di ploidia concorda con quello dedotto dalle osservazioni morfologiche condotte in campo.

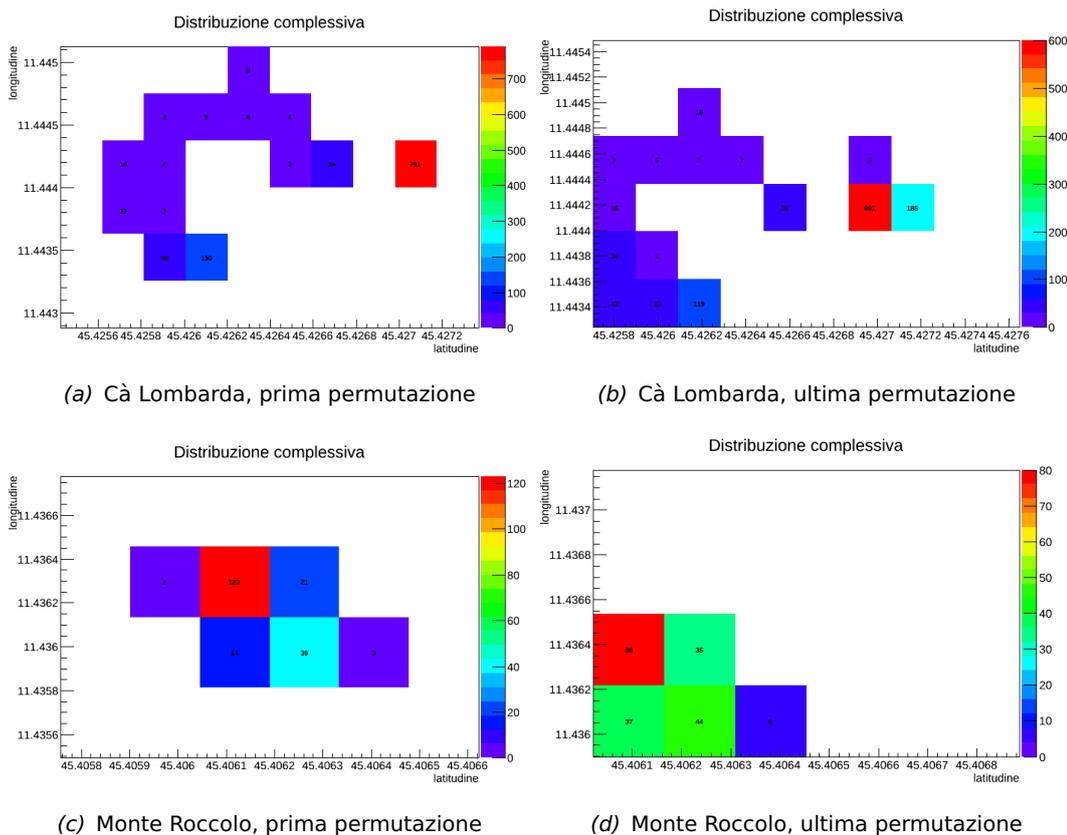


Figura 3.10: Calcolo dell'isolamento spaziale: posizione dei bin all'interno dell'area di studio per la prima e l'ultima permutazione.

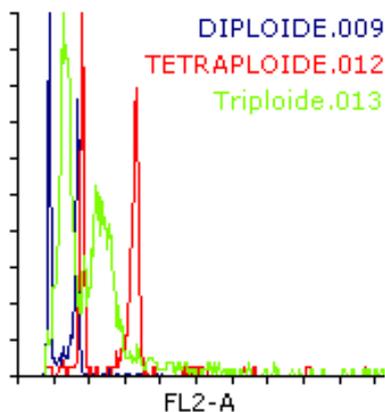


Figura 3.11: Output del citofluorimetro per diploidi, triploidi e tetraploidi.

Solo per 7 triploidi la stima citofluorometrica non corrispondeva all'attribuzione morfologica, e tali individui sono stati esclusi dalle successive analisi.

3.9 Pollen transfer

Complessivamente, per tutti i plot sperimentali sono stati osservati 22 scambi.

Tabella 3.5: Scambi di polline marcato in tetraploidi e diploidi.

Pianta ricevente	Polline di 2n	Polline di 4n
2n	6	3
4n	8	5

La tabella 3.5 riporta il numero di occorrenze di polline marcato sugli stigmi di diploidi e tetraploidi. Per le piante diploidi gli scambi intraploidia sono il doppio degli scambi interploidia, mentre per le piante tetraploidi sono più numerosi gli scambi interploidia.

Quindi complessivamente solo la metà degli scambi totali è avvenuto all'interno della stessa ploidia, indicando una pari probabilità di scambio di polline all'interno e tra le ploidie.

3.10 Incroci e vitalità dei semi

3.10.1 Impollinazioni manuali

La percentuale di successo (formazione del frutto) in ciascuna delle impollinazioni manuali è stata:

$$4n \times 4n = 10 / 30 = 33\%; \quad 4n\text{♀} \times 2n\text{♂} = 10 / 30 = 33\%;$$

$$2n\text{♀} \times 4n\text{♂} = 16 / 30 = 53.33\%; \quad 2n \times 2n = 21 / 30 = 70\%.$$

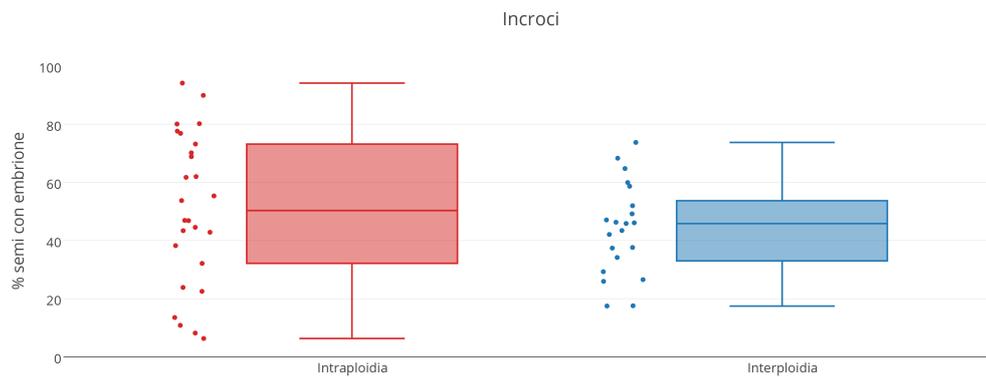
Nei tetraploidi non c'è differenza nella produzione di frutti inter ed intraploidia, mentre le piante diploidi hanno prodotto il 24% di frutti in più nell'incrocio intraploide rispetto a quello interploide.

3.10.2 Vitalità dei semi

Le capsule contenenti meno di 500 semi sono state escluse dalle successive analisi. La percentuale media di semi con embrione è stata:

$$4n \times 4n = 74.95 \pm 11.23 \text{ (9 frutti)}; \quad 4n\text{♀} \times 2n\text{♂} = 52.49 \pm 14.62 \text{ (10 frutti)}; \\ 2n \times 2n = 38.22 \pm 22.43 \text{ (17 frutti)}; \quad 2n\text{♀} \times 4n\text{♂} = 37.61 \pm 13.72 \text{ (12 frutti)}.$$

Per i tetraploidi l'incrocio interploide provoca un calo nei semi con embrione del 30% rispetto all'incrocio intraploide, mentre per i diploidi questo decremento è appena l'1.6%. Complessivamente, l'effetto detrimentalmente sulla produzione di semi embrionati tra incroci intraploidia ed interploidia ammonta al 15.83%.



Source: IncrociIntraInterPloidia_DEFINITIVO

Figura 3.12: Percentuale di semi con embrione negli incroci interploidia ($4n \times 2n$; $2n \times 4n$) ed intraploidia ($4n \times 4n$; $2n \times 2n$).

Nella figura 3.12 è riportato il confronto della percentuale tra semi con embrione negli incroci intraploidia ed interploidia. Un U-Test non ha rilevato una differenza significativa nella proporzione di semi con embrione tra gli incroci ($p\text{-value}=0.274$).

3.11 Indici di isolamento riproduttivo

Ogni barriera riproduttiva (RI) elimina parte del flusso genico che non è stato fermato dalle precedenti barriere. Il valore di ciascun RI, che va da 0 ad 1, corrisponde a quanta parte del flusso genico viene eliminato ad opera della barriera coinvolta.

Si ottiene l'isolamento riproduttivo complessivo (T) sommando i contributi relativi di ogni barriera all'eliminazione del flusso genico; pertanto $T=0$ in assenza di barriere e $T=1$ nel caso di isolamento completo.

3.11.1 $RI_{\text{PHENOLOGY}}$

Lo sfasamento dei periodi di fioritura è una delle prime barriere riproduttive ad agire.

$$RI_{\text{PHENOLOGY},4n} = 0.176 ; RI_{\text{PHENOLOGY},2n} = 0.819.$$

L'indice di isolamento medio è $RI_{\text{PHENOLOGY medio}} = 0.495$.

3.11.2 $RI_{\text{MICROHABITAT}}$

La distribuzione nello spazio delle piante influenza la probabilità di incrocio interploide.

$$\text{Cà Lombarda: } RI_{\text{MICROHABITAT}} = 1 - \frac{1810}{10848} = 0.833;$$

$$\text{Monte Roccolo: } RI_{\text{MICROHABITAT}} = 1 - \frac{1740}{4680} = 0.628.$$

$$\text{L'indice di isolamento medio è } RI_{\text{MICROHABITAT medio}} = 0.731.$$

3.11.3 $RI_{\text{PRE-POLL}}$

I dati degli esperimenti di pollen transfer consentono di calcolare l'indice di isolamento riproduttivo dovuto agli impollinatori.

$$RI_{\text{PRE-POLL}} = 1 - \frac{\text{proporzione scambi interploidia}}{\text{proporzione scambi intraploidia}} = 1 - \frac{0.5}{0.5} = 0.$$

3.11.4 $RI_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}}$

La mancata formazione del frutto in incroci interploidia è la prima barriera post-impollinazione.

$$RI_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}} = 1 - \frac{\text{proporzione frutti formati in incroci interploidia}}{\text{proporzione frutti formati in incroci intraploidia}} = 1 - \frac{0.433}{0.516} = 0.161.$$

3.11.5 RI_{EMBRYO}

La mortalità embrionale è la prima barriera post-zigotica.

$$RI_{\text{EMBRYO}} = 1 - \frac{\text{proporzione di semi embrionati incroci interspecifici}}{\text{proporzione di semi embrionati incroci intraspecifici}} = 1 - \frac{0.451}{0.566} = 0.203.$$

3.11.6 RI_{HYBRID}

Gli ibridi nella popolazione potrebbero fungere da ponte per lo scambio genico fra i citotipi parentali.

$$RI_{\text{HYBRID}} = 1 - \frac{\text{fruit set citotipo ibrido}}{\text{fruit set citotipi parentali}} = 1 - \frac{0.232}{0.268} = 0.134.$$

3.11.7 T: isolamento complessivo

Il contributo assoluto di ciascuna barriera all'isolamento riproduttivo è:

$AC_{\text{PHENOLOGY}} = 0.495$; $AC_{\text{MICROHABITAT}} = 0.731 \cdot (1 - 0.495) = 0.369$; $AC_{\text{PRE-POLL}} = 0$; $AC_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}} = 0.161 \cdot (1 - 0.864) = 0.022$; $AC_{\text{EMBRYO}} = 0.203 \cdot (1 - 0.886) = 0.023$; $AC_{\text{HYBRID}} = 0.134 \cdot (1 - 0.909) = 0.012$.

L'isolamento complessivo è dunque: $T = 0.495 + 0.369 + 0 + 0.022 + 0.023 + 0.012 = 0.921$.

La figura 3.13 mette a confronto la forza delle singole barriere riproduttive:

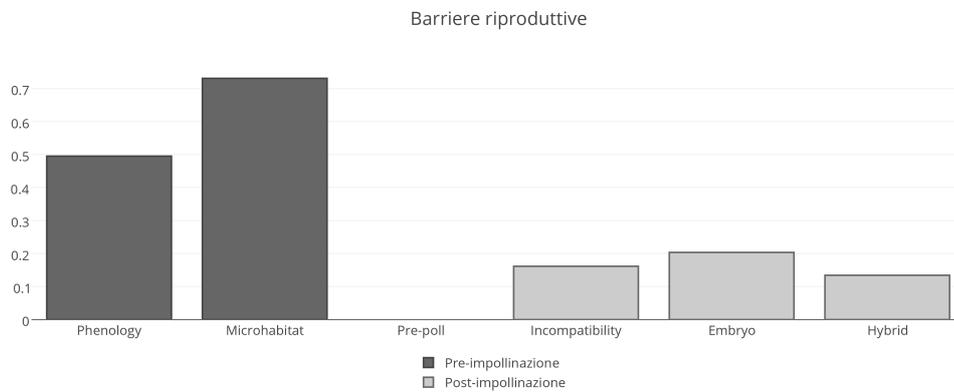


Figura 3.13: Forza delle singole barriere riproduttive.

Capitolo 4

Discussione

La speciazione avviene in seguito all'instaurarsi ed al mantenimento di barriere riproduttive tra popolazioni precedentemente interfeconde ([32], [43], [8]).

Seppure nelle prime fasi della divergenza tra specie incipienti l'isolamento riproduttivo si instaura solo grazie al contributo di una o poche barriere, spesso più barriere concorrono poi all'isolamento tra le specie. È ancora oggetto di dibattito quali barriere (prezigotiche o post-zigotiche) siano maggiormente in grado di promuovere la speciazione, ma è chiaro che quelle coinvolte nelle prime fasi sono certamente le più importanti ([26]). Oltre al tipo di barriere riproduttive, anche la modalità del processo di speciazione, in presenza o in assenza di isolamento geografico tra le potenziali specie, ha un ruolo fondamentale nel rendere più o meno probabile l'instaurarsi di barriere ([6]).

Mentre la speciazione allopatrica è uno dei meccanismi più diffusi e meglio studiati, le evidenze di speciazione simpatica sono ancora poche ed oggetto di discussione ([14]). Fa eccezione la speciazione simpatica per poliploidia. In questo caso, molto diffuso nel regno vegetale, la differente ploidia genera immediatamente isolamento riproduttivo dal progenitore diploide a causa della sterilità dell'ibrido triploide (isolamento post-zigotico). Sebbene la differente ploidia è condizione sufficiente a garantire isolamento riproduttivo, nonostante ciò, in assenza di isolamento ecologico e di altre barriere riproduttive, il tetraploide si troverà a competere con il suo progenitore diploide (occupandone la stessa nicchia ecologica) e frequentemente è destinato ad una rapida estinzione ([36]).

Nel presente caso di studio, *A. pyramidalis* presenta due forme ploidiche simpatiche che occorrono naturalmente nelle stazioni di crescita. L'evento di poliploidizzazione ha rappresentato una speciazione istantanea ([36], [42]), e tetraploidi e diploidi possono essere considerate due specie incipienti, non ancora separate. Quello in analisi è un caso di possibile speciazione in corso, ed è uno

dei fenomeni più interessanti da studiare per comprendere come possano formarsi nuove specie ([7]; [28]).

Infatti in questo caso, il citotipo tetraploide sembra essere in grado di convivere con il suo progenitore diploide, anzi è relativamente dominante in condizioni di simpatria, suggerendo che qualche forma di divergenza permette la coesistenza delle due forme e quindi il consolidarsi del processo di speciazione. Analogamente, in simpatria le due ploidie dovrebbero tendere ad isolarsi riproduttivamente per evitare lo spreco di gameti e la formazione di prole ibrida sterile (che determinerebbe una diminuzione della fitness) attraverso l'instaurarsi di ulteriori barriere riproduttive ([43]). Gli esperimenti condotti in questa tesi hanno quindi lo scopo di identificare le possibili forme di divergenza ecologica tra i due citotipi e l'eventuale presenza di altre barriere riproduttive che possono concorrere per garantire un miglior isolamento tra le due forme.

4.1 Divergenza ecologica e fenotipica

L'analisi della divergenza ecologica e fenotipica di entità poliploidi presuppone di poter discriminare in campo le diverse ploidie dell'organismo, ed in *A. pyramidalis* ciò è possibile grazie a differenze nel periodo di fioritura, altezza della pianta, numero e colore dei fiori.

La stima della ploidia in base a caratteri morfologici si è rivelata congruente con il dato citometrico nella grande maggioranza dei casi, e si può pertanto considerare affidabile. Va però notato che il grado di accuratezza potrebbe essere stato viziato dal fatto che sono stati evitati esemplari con caratteri intermedi, per i quali l'assegnazione della ploidia su base morfologica è incerta. In effetti, gli unici casi di discordanza sono stati individui segnalati come possibili triploidi, che presentano caratteristiche intermedie, mentre tutti i tetraploidi ed i diploidi sono stati identificati correttamente.

Nel complesso, sono state rilevate differenze morfologiche a scala fine nei tratti fiorali tra le due ploidie. Tale risultato non è inatteso in quanto è noto che la poliploidizzazione generalmente provoca un aumento delle dimensioni in seguito a sovraespressione genica dovuta alla presenza di un doppio corredo cromosomico ([42], [15], [36]). In genere i tratti fiorali correlano fortemente tra loro, tuttavia per i tetraploidi questa correlazione è relativamente più debole di quanto lo sia per i diploidi. La perdita di correlazione nei tratti fiorali potrebbe essere dovuta a genome shock ([58], [15]) in seguito all'evento di poliploidizzazione. Questo potrebbe aver alterato i pattern di espressione genica, provocando uno squilibrio nei tratti fenotipici, tra i cui i caratteri fiorali. È anche possibile che la perdita di reciproca dipendenza dei tratti fiorali

possa aver generato inedite combinazioni degli stessi, presentando un'ampia variabilità all'azione della selezione. Ciononostante, non sembra essere stata compromessa la capacità dei tetraploidi di attrarre gli impollinatori, manifestando questi un fruit set elevato, persino più dei diploidi. Una maggiore espressione fenotipica nei fiori delle tetraploidi è evidente anche nel colore del fiore, che ha un ruolo importante nell'attrarre i pronubi ([24], [4]).

L'insieme di queste variazioni nei tratti fiorali (principalmente una sovradimensione e sovraespressione dei tratti) potrebbe spiegare la maggiore attrattività dei fiori delle tetraploidi rispetto alle diploidi (come mostrato dai risultati del fruit set) e conferire quindi alle prime un vantaggio selettivo rispetto a queste ultime. Anche la differenza in dimensioni e nella densità delle infiorescenze è un effetto tipico della poliploidizzazione ([42], [22], [55], [16], [17]), però, in contrasto con la norma, nel caso di *A. pyramidalis* si verifica l'opposto, con le piante poliploidi che hanno meno fiori e infiorescenze più corte. Non è chiaro se queste ridotte dimensioni sono il risultato di particolari riarrangiamenti nel genoma poliploide o siano frutto recente della selezione da impollinatori.

Chiaramente il successo riproduttivo di un individuo risente di una serie di variabili estrinseche oltre che del background genetico. I fattori che possono influenzare il fruit set sono molteplici: condizioni climatiche, attività degli impollinatori, ma anche il contesto ambientale (es.: prato rado o fitto, altezza delle piante circostanti, esposizione al vento, ecc) ed ecologico in cui si trova ogni singolo individuo. Ad esempio, nel presente studio si è osservata una notevole differenza nel successo riproduttivo delle due ploidie di *A. pyramidalis* nelle due stazioni esaminate. In particolare il fruit set è stato basso per entrambe le ploidie nella stazione del Monte Roccio. Tale fenomeno è probabilmente da attribuire al disturbo del sito durante il periodo di fioritura (sfalcio precoce dei campi nei dintorni, perciò meno fiori di altre specie che attraggano i pronubi) ed alle diverse caratteristiche stazionali (la stazione di Cà Lombarda presenta una maggiore diversità di specie nettariifere da osservazioni in campo). Globalmente comunque, nei due anni di osservazione, le piante poliploidi hanno un fruit set più elevato delle diploidi.

Il minor fruit set delle diploidi rispetto alle tetraploidi in entrambe le stazioni potrebbe essere dovuto alle peggiori condizioni meteorologiche durante la loro fioritura e fruttificazione rispetto a quelle sperimentate dalle tetraploidi (vedi appendice A). In effetti la deviazione standard del fruit set è più elevata per i diploidi che per i tetraploidi, e questo è congruente con condizioni ambientali più stringenti, che potrebbero aver fatto emergere differenze nella performance degli individui più di quanto sarebbe accaduto in condizioni favorevoli. I dati preliminari raccolti nel 2013 tuttavia concordano sul fatto che i tetraploidi hanno comunque una fitness

maggiore dei diploidi, perciò da sole le differenti condizioni ambientali non spiegano la differenza osservata ed è quindi plausibile che questa differenza risieda anche in una maggiore attrattività dei tetraploidi rispetto ai diploidi. A conferma di ciò c'è una differente correlazione dei tratti fiorali di diploidi e tetraploidi con il rispettivo fruit set.

Solitamente, nelle Orchidee, le infiorescenze più alte beneficiano di più visite dai pronubi e di un fruit set maggiore: l'altezza dell'infiorescenza è quindi un tratto spesso sottoposto a selezione ([63], [19]). È probabilmente questo il caso nei tetraploidi, mediamente più bassi dei diploidi, mentre in questi ultimi la correlazione non è molto marcata, segno che la selezione per l'altezza presenta un gradiente di intensità, e che forse nei diploidi il tratto è già spinto al suo estremo (confronto della deviazione standard del tratto in tetraploidi e diploidi) e quindi non può variare più di tanto. Di contro, l'aumento in dimensione dei fiori è un tratto sottoposto a selezione nei diploidi ma non nei tetraploidi, che possiedono un fiore già mediamente più grande.

È particolarmente interessante che i tratti fiorali più correlati al fruit set nei diploidi sono anche quelli con le differenze maggiori rispetto ai tetraploidi: ciò potrebbe essere l'effetto della competizione per gli impollinatori tra le due ploidie ([24]). La fioritura tardiva sottopone infatti i diploidi ad una pressione selettiva per l'aumento del display florale, perché gli impollinatori, che sono già venuti in contatto con i tetraploidi (che fioriscono prima ed hanno fiori più grandi), selezioneranno i fiori di dimensioni maggiori. Questo effetto competitivo è ulteriormente esacerbato dal rapporto numerico tra esemplari tetraploidi e diploidi, a favore dei primi.

La divergenza florale tra diploidi e tetraploidi non ha condotto (ancora) alla selezione di differenti impollinatori, come confermato dagli esperimenti di pollen transfer. In particolare, da questi esperimenti si evince che gli impollinatori spostano il polline indifferentemente tra le due ploidie, contribuendo quindi molto poco alla divergenza ecologica florale. I diploidi sembrano quindi svantaggiati nella competizione per gli stessi impollinatori (come confermato dalla maggiore selezione sui loro tratti fiorali), e questa potrebbe anche rappresentare una spiegazione evolutiva della differenza nel periodo di fioritura tra le due ploidie.

È noto che popolazioni in simpatria tendono a divergere per evitare la competizione (principio di esclusione competitiva [53] e selezione divergente, [43]), ma l'asincronia fenologica riscontrata potrebbe anche essere causata da fattori non selettivi come la diversa ploidia o l'occupazione di diverse microniche ([22], [55]). I dati raccolti indicano infatti un certo grado di differenziamento ecologico tra tetraploidi e diploidi, indizio di una diversa preferenza di microniche tra le ploidie ([55]). Ciò potrebbe essere una con-

sequenza della poliploidizzazione ([42]) o un risultato dell'interazione genotipo-ambiente, o ancora, l'effetto di selezione divergente o esclusione competitiva. In effetti, studi condotti su orchidee terrestri hanno evidenziato come specie diverse che vivono in simpatria tendono ad instaurare simbiosi micorriziche con differenti funghi del suolo, suggerendo quindi un meccanismo di esclusione competitiva ([3]). L'occupazione di diverse micronicchie ecologiche sembra però poco plausibile come unico fattore determinante lo sfasamento delle fioriture, dato che le due ploidie sui Colli Berici occorrono quasi sempre insieme nelle stazioni di crescita, che hanno generalmente limitata estensione (D. Doro, comunicazione personale).

4.2 Isolamento riproduttivo

La limitazione del flusso genico si struttura gerarchicamente: solo il flusso genico residuo dall'azione delle barriere che agiscono prima sarà sottoposto all'azione delle barriere successive, che agiranno quindi solo sulla parte residua del flusso potenziale (cioè in assenza di isolamento).

In questo studio si sono analizzate caratteristiche di *A. pyramidalis* tetraploidi e diploidi che potrebbero essere coinvolte nella formazione e mantenimento delle barriere riproduttive, e si è seguito un approccio plurale nella definizione dell'importanza di ciascun meccanismo coinvolto nella riduzione del flusso genico potenziale ([16], [29], [41], [50]).

Nonostante sia stato criticato in alcune sue applicazioni ([29]), l'approccio proposto da Coyne ed Orr (1989) ha portato grandi progressi nella comprensione dei molteplici meccanismi in opera nell'isolamento delle popolazioni, specialmente in condizioni di simpatria in cui spesso non è ovvia la preponderanza di una barriera rispetto alle altre (com'è invece nella speciazione allopatrica: segregazione geografica o temporale) ([28]).

Martin e Willis (2007) hanno sollevato perplessità circa la validità di stime di isolamento in presenza di barriere asimmetriche, specialmente per quanto riguarda i contributi assoluti delle singole barriere all'isolamento complessivo. Per evitare queste difficoltà concettuali si è evitato di calcolare il contributo cumulativo assoluto di ogni barriera all'isolamento, e si sono discusse le implicazioni di ogni stadio confrontandone l'importanza relativa.

Differenze nella morfologia dei fiori posso fungere da barriera pre-impollinazione attirando gruppi diversi di impollinatori ([24], [4]), e questo potrebbe ostacolare il flusso genico interploidia ([22], [16], [55]). Data anche la scarsa differenziazione morfologica delle ploidie in *A. pyramidalis*, è lecito attendersi una larga condivisione

degli impollinatori, che di fatto aumenta la probabilità di scambio interploidia: un dato ampiamente confermato dagli esperimenti sul trasferimento del polline. Infatti, nel complesso non sembra emergere una tendenza dei pronubi a spostare il polline di preferenza all'interno della stessa ploidia piuttosto che tra ploidie, pertanto l'isolamento dovuto agli impollinatori è da considerarsi pressoché nullo.

La segregazione fenologica è una delle prime barriere, in ordine di azione, che possono diminuire l'interscambio tra le due ploidie in *A. pyramidalis*. L'isolamento temporale è asimmetrico: l'introgresione di geni eteroploidi è più probabile per i tetraploidi che per i diploidi, essendo nei primi una parte maggiore dei fiori aperti durante la sovrapposizione con l'altra ploidia. La fioritura tardiva dei diploidi potrebbe quindi, come già detto, essere una risposta adattativa a questa potenziale introgresione, che consentirebbe anche di ridurre lo spreco di gameti in incroci interploidia con fitness inferiore. L'isolamento fenologico nel complesso riduce di circa la metà l'opportunità di incroci interploidia, ed è perciò il secondo fattore più importante nel mantenere l'integrità genetica delle due ploidie.

Il contributo relativo più importante all'isolamento è tuttavia quello dato dalla ripartizione spaziale delle due ploidie, che da solo rende conto del 73% della riduzione del flusso genico. Va tenuto presente che tale indice è stato calcolato sulla base di una simulazione basata su un unico impollinatore, anche se il più comune. Ci sono infatti altri gruppi di Lepidotteri con distanza di volo e capacità di dispersione molto maggiori ([25], [60]). Utilizzando una specie sedentaria come *Zygaena*, si ottiene una stima del massimo isolamento possibile data la distribuzione delle piante osservata, ma l'isolamento riproduttivo reale (al quale concorrono più specie di impollinatori) è probabilmente più basso di quello calcolato. L'approccio adottato non consente inoltre di esplorare le cause che determinano la ripartizione nello spazio, bensì esamina solamente l'esito dell'interazione dell'ambiente con il genotipo.

Queste due barriere pre-zigotiche (fenologia ed isolamento spaziale) sono senz'altro una chiara conseguenza della divergenza ecologica tra le due ploidie. Invece, le barriere post-impollinazione si sono rivelate ancora inefficaci e pressoché ininfluenti nel contribuire a mantenere l'isolamento tra i citotipi.

È stata osservata una differenza nel fruit set delle impollinazioni manuali solo nei diploidi, e questo potrebbe derivare da un'incompatibilità col polline eteroploide più marcata rispetto ai tetraploidi. Ciò è consistente con l'abbondanza di queste ultime rispetto ai diploidi: sebbene infatti l'isolamento fenologico sia più alto in questi ultimi, la grande quantità di piante tetraploidi fa sì che il polline diploide sia meno rappresentato nel pool pollinico totale, esponendo i diploidi ad un maggior rischio di incrocio interploidia.

Questo potrebbe aver portato ad un rafforzamento dell'isolamento post-impollinazione nei diploidi ma non nei tetraploidi, ed è potenzialmente un effetto diretto dell'asimmetria nell'isolamento fenologico. Nel complesso l' $R_{\text{POLLEN-STIGMA INCOMPATIBILITY}}$ provoca però una modesta riduzione del flusso genico (16.1%).

La differenza tra la proporzione di semi vitali in incroci intraploidia ed interploidia non risulta statisticamente significativa, ad indicazione che sembrerebbe essere possibile incrociare le due ploidie per produrre una progenie triploide.

Nei pochi individui triploidi rinvenuti il fruit set è stato intermedio rispetto ai citotipi parentali, indicando che sono comunque in grado di attrarre pronubi ([51], [24]). Il fatto che l'ibrido (triploide) sia in grado di fruttificare ovviamente non realizza necessariamente un flusso genico tra i genomi parentali; perché ciò si verifichi deve essere dimostrata la vitalità dei semi dell'ibrido (evento improbabile, poiché essendo il numero cromosomico dispari, alla meiosi i cromosomi non potrebbero appaiarsi correttamente, impedendo la formazione di gameti funzionali [28]) e la capacità di generare prole in grado di riprodursi a sua volta. Il limitato contributo all'isolamento dato da questa barriera è quindi probabilmente maggiore di quanto stimato, dato anche il numero trascurabile di ibridi ritrovati nelle popolazioni.

Nel complesso, l'importanza delle barriere pre-impollinazione risulta determinante nel limitare il flusso genico tra le due ploidie, mentre quelle post-impollinazione contribuiscono in maniera molto minore. Questo risultato rispecchia la tendenza generale delle Angiosperme ([24], [28], [29], [41]), ma va contro il trend riscontrato nelle ultime ricerche per le Orchidee ad inganno alimentare ([48], [49], [9], [10]) dove l'isolamento è principalmente postzigotico. Nel caso di *A. pyramidalis* quindi la divergenza ecologica contribuisce direttamente a generare isolamento riproduttivo pre-impollinazione ed a garantire la coesistenza dei due citotipi.

L'isolamento riproduttivo totale tra le due ploidie risulta essere elevato (comparabile ed a volte superiore a quello di molte specie ben distinte di Orchidee [48], [49]), non impedendo però del tutto l'interscambio. La proporzione di flusso genico rimasta dopo l'azione di tutte le barriere rappresenta la proporzione attesa di individui ibridi (triploidi in questo caso) nella popolazione. Tale valore atteso è 0.079, e la proporzione osservata di triploidi è 0.048 (n° individui triploidi campionati / n° individui totali campionati). Va sottolineato che le fonti di errore in queste stime sono molteplici, ma il fatto che il valore atteso e quello osservato siano confrontabili corrobora, seppur solo parzialmente, la validità dell'approccio adottato.

Capitolo 5

Conclusioni

Indipendentemente dalla presenza o meno di isolamento geografico, e quindi che si tratti di speciazione allopatrica o simpatica, oggi si ritiene che in entrambe le condizioni la divergenza ecologica mediata dall'azione della selezione divergente sia il meccanismo principale di speciazione, con le barriere riproduttive che si generano come conseguenza indiretta della divergenza ([45], [47]). Alternativa a questo modello generale, la speciazione "improvvisa" mediante duplicazione del corredo cromosomico (poliploidia) è considerata un processo importante per l'evoluzione e la speciazione delle piante a fiore ([35], [42]).

In questo meccanismo di speciazione su base genomica, l'isolamento riproduttivo è immediato e di tipo post-zigotico, basato sulla sterilità dell'ibrido triploide. Mentre in passato i due meccanismi di speciazione erano considerati alternativi, oggi si ritiene che la divergenza ecologica contribuisca al rafforzamento dell'isolamento riproduttivo nella speciazione per poliploidia ([28]).

È questo il caso della presente ricerca. Sebbene infatti la poliploidizzazione sia stato certamente l'evento che ha generato un nuovo citotipo (isolato riproduttivamente dal progenitore diploide), la divergenza ecologica tra le due ploidie, risultante dall'azione selettiva per ridurre la competizione, contribuisce a rafforzare l'isolamento riproduttivo mediante la formazione di nuove barriere pre-zigotiche (separazione spaziale e fenologica, [42]).

Queste barriere, che sicuramente eliminano gran parte del flusso genico pre-zigotico, non comportano una effettiva riduzione del flusso genico tra i due citotipi, che sono già riproduttivamente isolati dalla sterilità dell'ibrido triploide, ma riducono significativamente lo spreco di gameti in svantaggiose ibridazioni interploidie. Si configurano quindi come meccanismi di isolamento non coinvolti nelle prime fasi del processo di speciazione, ma che subentrano solo in un secondo momento per meglio garantire l'isolamento delle specie quando si ritrovano contatto tra loro (reinforcement), come nelle stazioni di studio.

Accade spesso nella speciazione ecologica, dove le barriere pre-zigotiche evolvono prima di quelle post-zigotiche (ed anche in questo caso di speciazione per poliploidia), che la divergenza ecologica contribuisca alla formazione di barriere pre-zigotiche mentre altre post-zigotiche (interazione polline-stigma, vitalità dell'embrione) non sono ancora comparse tra le due ploidie, forse a causa dei ridotti tempi di evoluzione del fenomeno in questione ([45]).

D'altro canto, è pur vero che le barriere pre-zigotiche sono le più importanti per evitare lo spreco di gameti ([28]), quindi è evidente che sono quelle maggiormente sottoposte all'azione della selezione naturale.

Un altro aspetto evidenziato da questo studio è, nel contesto della poliploidia rispetto all'evoluzione, il fatto che gli autopoliploidi non siano solitamente svantaggiati sul piano adattativo rispetto ai diploidi e quindi facilmente soggetti a rapida estinzione. Infatti importanti attributi genetici, come l'aumento di molteplicità enzimatica e l'aumento di diversità allelica, di fatto forniscono soluzioni di grande successo adattativo in natura ([36]). I risultati sulla fitness e sulla distribuzione spaziale delle ploidie confermano questa ipotesi ed evidenziano una notevole potenzialità adattativa dei tetraploidi anche in condizioni di coesistenza con i diploidi.

È chiaramente difficile prevedere le traiettoria dei processi evolutivi in atto, ma un potenziale problema legato alla loro permanenza in simpatria sembra possa essere risolto da una divergenza sempre maggiore nelle preferenze ecologiche di tetraploidi e diploidi, che evitano in tal modo la reciproca competizione (per lo spazio, le risorse, i partner fungini, gli impollinatori, ecc), e da barriere riproduttive che si generano in conseguenza di questa divergenza.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il mio correlatore, senza il quale il presente lavoro non sarebbe stato possibile né sarebbe stato portato a termine;

Il Sig. Daniele Doro, per avermi accompagnato nelle località dei Colli Berici dove è stato condotto lo studio e per le utili indicazioni;

Sonia e la mia famiglia per l'incessante supporto ed incoraggiamento durante tutto il lavoro.

Appendice A

Altro materiale



(a) Aspetto tipico diploide



(b) Aspetto della pianta durante la fruttificazione



(c) Fiore impollinato; è possibile vedere le massule di polline sugli stigmi



(d) Aspetto tipico tetraploide

Figura A.1: Foto scattate sul campo

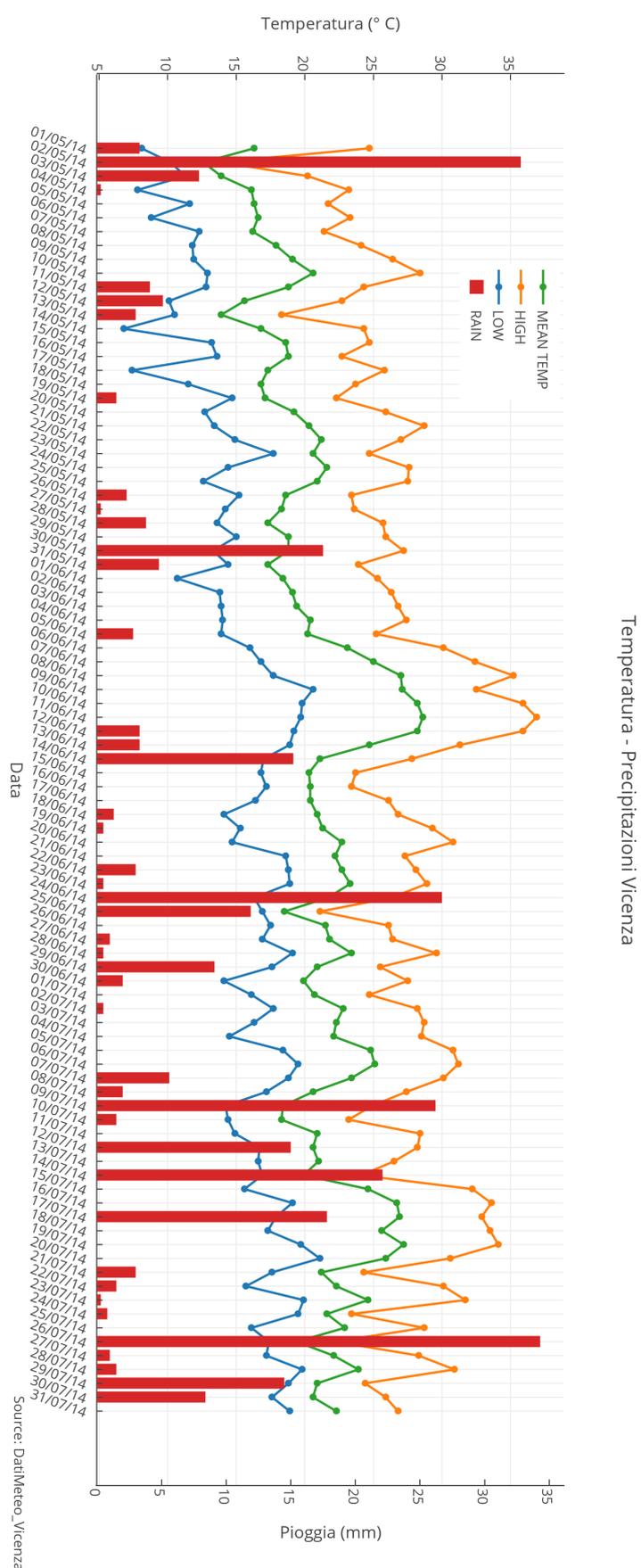


Figura A.2: Temperatura massima, media, minima e precipitazioni Vicenza Maggio-Luglio 2014.

Tabella A.1: ρ 4n

Coefficient	Y.Sp	Y.SepDx	Y.SepCen	Y.PetSx	Y.PetDx	Y.LobMed	Y.Lab	X.Sp.Met	X.Sp.Fauc	X.Sp.Ap	X.SepSx	X.SepDx	X.SepCen	X.PetSx	X.PetDx	X.LobMed	X.LobLat	X.Lab.Max	N.frutti	N.fiori	Fruit Set	Altezza
Y.Sp	1.000	0.316	0.274	0.294	0.272	0.323	0.326	0.290	0.183	0.231	0.070	0.162	0.167	0.125	0.121	0.250	0.348	0.555	0.250	-0.162	0.297	0.124
Y.SepDx	0.274	1.000	0.653	0.754	0.577	0.329	0.555	0.222	0.037	0.031	0.070	0.457	0.409	0.286	0.204	0.305	0.455	0.480	0.406	0.106	0.333	0.287
Y.SepCen	0.653	0.754	1.000	0.608	0.605	0.603	0.347	0.683	0.074	-0.057	0.512	0.503	0.362	0.451	0.457	0.475	0.351	0.480	0.406	0.209	0.388	0.366
Y.PetSx	0.577	0.605	0.603	1.000	0.618	0.731	0.484	0.539	0.229	0.174	0.159	0.230	0.263	0.330	0.306	0.430	0.631	0.320	0.503	0.175	0.504	0.316
Y.PetDx	0.323	0.567	0.603	0.731	1.000	0.849	0.424	0.442	0.379	0.288	0.094	0.463	0.421	0.610	0.480	0.349	0.193	0.385	0.396	0.087	0.396	0.277
Y.LobMed	0.326	0.555	0.603	0.731	0.849	1.000	0.424	0.542	0.380	0.148	0.369	0.280	0.374	0.459	0.389	0.387	0.301	0.543	0.475	0.123	0.489	0.327
Y.Lab	0.326	0.555	0.683	0.539	0.442	0.542	1.000	0.183	0.151	0.047	0.259	0.391	0.213	0.292	0.358	0.473	0.411	0.555	0.502	-0.195	0.543	0.344
X.Sp.Met	0.290	0.222	0.339	0.379	0.380	0.320	0.183	1.000	0.540	0.640	0.049	0.045	0.066	0.135	0.207	0.322	0.018	0.244	0.240	-0.019	0.299	0.106
X.Sp.Fauc	0.183	0.037	0.070	0.183	0.183	0.183	0.183	0.540	1.000	0.403	0.187	0.042	0.200	0.139	0.057	0.291	-0.139	0.126	0.111	-0.102	0.200	-0.037
X.Sp.Ap	0.070	0.031	0.070	0.031	0.031	0.031	0.031	0.049	0.403	1.000	-0.014	0.014	0.010	0.030	0.121	0.134	0.134	0.286	0.219	0.043	0.227	0.195
X.SepSx	0.457	0.409	0.475	0.409	0.409	0.409	0.409	0.409	0.409	0.010	1.000	0.680	0.631	0.511	0.461	0.293	0.240	0.286	-0.038	-0.182	0.024	0.132
X.SepDx	0.409	0.475	0.503	0.395	0.334	0.280	0.152	0.391	0.045	0.042	0.680	1.000	0.657	0.463	0.578	0.405	0.377	0.345	0.444	0.008	0.272	0.357
X.SepCen	0.167	0.274	0.362	0.275	0.374	0.080	0.213	0.066	0.200	0.010	0.631	0.657	1.000	0.562	0.466	0.127	0.217	0.217	0.190	-0.082	0.211	0.192
X.PetSx	0.125	0.409	0.451	0.330	0.610	0.459	0.100	0.292	0.135	0.139	0.030	0.511	0.463	1.000	0.706	0.430	0.087	0.184	0.252	0.170	0.167	0.297
X.PetDx	0.121	0.286	0.457	0.306	0.480	0.389	0.219	0.358	0.207	0.057	0.461	0.578	0.563	0.706	1.000	0.503	0.297	0.289	0.361	0.189	0.320	0.324
X.LobMed	0.250	0.204	0.475	0.262	0.349	0.387	0.042	0.473	0.322	0.291	0.134	0.293	0.405	0.466	0.430	1.000	0.164	0.323	0.389	0.306	0.322	0.408
X.LobLat	0.348	0.305	0.351	0.430	0.193	0.301	0.411	0.018	-0.139	0.134	0.240	0.377	0.127	0.087	0.297	0.164	1.000	0.742	0.330	0.146	0.320	0.323
X.Lab.Max	0.555	0.455	0.480	0.631	0.385	0.543	0.585	0.555	0.244	0.126	0.286	0.180	0.345	0.217	0.184	0.289	0.323	1.000	0.549	0.241	0.544	0.426
N.frutti	0.250	0.337	0.406	0.503	0.396	0.475	0.210	0.502	0.240	0.111	0.219	-0.038	0.244	0.190	0.252	0.361	0.389	0.330	1.000	0.594	0.908	0.755
N.fiori	-0.162	0.106	0.209	0.175	0.087	0.123	-0.033	-0.195	-0.102	0.043	-0.182	0.008	-0.082	0.170	0.189	0.306	0.146	0.241	1.000	0.262	0.622	0.622
Fruit Set	0.297	0.333	0.388	0.504	0.396	0.489	0.251	0.543	0.299	0.200	0.227	0.024	0.272	0.211	0.167	0.320	0.320	0.544	0.908	0.262	1.000	0.603
Altezza	0.124	0.287	0.366	0.316	0.277	0.327	0.344	0.106	-0.037	0.195	0.132	0.357	0.192	0.297	0.324	0.408	0.323	0.446	0.755	0.622	0.603	1.000

Tabella A.2: p-value 4n

n	p	Y.Sp	Y.SepDx	Y.SepCen	Y.PetSx	Y.PetDx	Y.LobMed	Y.Lab	X.Sp.Met	X.Sp.Fauc	X.Sp.Ap	X.SepSx	X.SepDx	X.SepCen	X.PetSx	X.PetDx	X.LobMed	X.LobLat	X.Lab.Max	N.frutti	N.fiori	Fruit Set	Altezza
Y.Sp	NA	1.478E-2	3.601E-2	2.395E-2	3.738E-2	1.253E-2	1.163E-2	2.596E-2	1.646E-1	7.852E-4	2.199E-1	2.062E-1	2.062E-1	3.453E-1	3.453E-1	5.633E-2	6.892E-2	4.990E-6	7.066E-2	2.567E-1	3.424E-2	3.502E-1	
Y.SepDx	59	NA	2.105E-8	5.216E-12	1.696E-6	2.888E-6	1.085E-2	5.074E-6	7.786E-1	8.140E-1	5.078E-3	2.733E-4	3.540E-2	1.285E-3	1.285E-3	7.862E-2	1.882E-2	2.958E-4	1.353E-2	4.609E-1	1.680E-2	2.739E-2	
Y.SepCen	59	NA	3.347E-7	3.813E-7	1.853E-7	4.879E-11	1.010E-4	1.046E-5	8.096E-3	1.875E-1	3.374E-5	4.916E-5	4.904E-2	3.390E-4	2.747E-4	1.428E-4	6.378E-3	1.180E-4	2.583E-3	1.409E-1	4.865E-3	4.346E-2	
Y.PetSx	59	59	59	59	NA	1.953E-17	2.964E-2	4.644E-4	3.027E-3	2.718E-2	2.251E-2	9.662E-3	8.864E-4	2.908E-7	1.192E-4	4.537E-2	1.423E-1	8.485E-8	1.250E-4	2.204E-1	1.639E-4	1.474E-2	
Y.PetDx	59	59	59	59	NA	1.953E-17	8.188E-4	9.321E-6	3.025E-3	1.535E-2	4.311E-1	4.010E-3	3.197E-2	3.533E-3	2.548E-4	2.482E-3	2.037E-2	9.036E-6	3.336E-3	5.437E-1	4.000E-3	3.388E-2	
Y.LobMed	59	59	59	59	NA	1.953E-17	NA	5.664E-3	1.362E-2	2.645E-1	1.896E-1	2.498E-1	5.470E-1	4.510E-1	9.553E-2	7.530E-1	1.020E-6	1.141E-6	1.315E-1	8.176E-1	7.568E-2	5.837E-1	
Y.Lab	59	59	59	59	59	59	59	NA	1.644E-1	1.011E-5	4.789E-8	7.123E-1	7.367E-1	6.178E-1	3.070E-1	1.153E-1	1.284E-2	8.949E-1	6.309E-2	8.371E-2	8.950E-1	3.287E-2	
X.Sp.Met	59	59	59	59	59	59	59	NA	NA	1.011E-5	4.789E-8	7.123E-1	7.367E-1	6.178E-1	3.070E-1	1.153E-1	1.284E-2	8.949E-1	6.309E-2	8.371E-2	8.950E-1	3.287E-2	
X.Sp.Fauc	59	59	59	59	59	59	59	NA	1.536E-3	1.572E-1	7.572E-1	1.284E-1	2.952E-1	6.695E-1	2.557E-2	2.954E-1	3.422E-1	4.305E-1	4.782E-1	1.590E-1	1.789E-1		
X.SepSx	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	9.142E-1	9.160E-1	8.240E-1	8.240E-1	8.240E-1	8.240E-1							
X.SepDx	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	3.167E-9	8.463E-8	3.510E-5	2.431E-2	6.670E-2	7.200E-1	7.877E-1	7.010E-1	7.877E-1	7.010E-1	8.665E-1	3.202E-1	
X.SepCen	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	1.555E-8	2.409E-4	1.665E-6	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	3.222E-3	
X.PetSx	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	3.508E-6	2.009E-4	3.591E-1	9.897E-2	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	1.638E-1	
X.PetDx	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	4.350E-10	6.835E-4	5.138E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	2.663E-2	
X.LobMed	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	4.888E-5	2.238E-2	3.959E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	2.912E-2	
X.LobLat	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	1.572E-11	NA	NA	NA	NA								
X.Lab.Max	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	NA	2.106E-5	8.099E-2	3.669E-5	3.669E-5	3.669E-5	3.669E-5							
N.frutti	51	51	51	51	51	51	51	NA	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	
N.fiori	51	51	51	51	51	51	51	NA	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	
Fruit Set	51	51	51	51	51	51	51	NA	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	
Altezza	59	59	59	59	59	59	59	NA	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	

Bibliografia

- [1] Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences - Ashman, T. L., T. M. Knight, J. A. Steets, P. Amarasekare, M. Burd, D. R. Campbell, M. R. Dudash, M. O. Johnston, S. J. Mazer, R. J. Mitchell, M. T. Morgan, and W. G. Wilson - *Ecology*, 85:2408-2421, 2004
- [2] Phylogeny and Evolution of Orchis and Allied Genera Based on ITS DNA Variation: Morphological Gaps and Molecular Continuity - S. Aceto, P. Caputo, S. Cozzolino, L. Gaudio, A. Morretti - *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 13, No. 1, October, 67-76, 1999
- [3] Speciation via floral heterochrony and presumed mycorrhizal host switching of endemic butterfly orchids on the Azorean archipelago - R.M. Bateman, P.J. Rudall, M.I. Bidartondo, S. Cozzolino, V. Tranchida-Lombardo, M.A. Carine, M. Moura - *American Journal of Botany* 101(6), 979-1001, 2014
- [4] Allele substitution at a flower locus produces a pollinator shift in monkeyflowers - H.D. Bradshaw Jr, D.W. Schemske - *Nature*, Vol. 426, 2003
- [5] Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) - S. Bory, O. Catrice, S. Brown, I.J. Leitch, R. Gigant, F. Chiroleu, M. Grisoni - *Genome* 51, 816-826, 2008
- [6] Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? - R.K. Butlin, J. Galindo, J.W. Grahame - *Philosophical Transaction of the Royal Society*, 363, 2997-3007, 2008
- [7] Patterns of speciation in *Drosophila* - J.A. Coyne and H. A. Orr - *Evolution* 43(2), 362-381, 1989
- [8] *Speciation* - J. A. Coyne and H. A. Orr 2004 - Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- [9] Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity - S. Cozzolino, S. D'Emerico, A. Widmer -

- Proceedings of the Royal Society B (Suppl.) 271, S259-S262, 2004
- [10] Evidence for pollinator sharing in Mediterranean nectar-mimic orchids: absence of premating barriers? - S. Cozzolino, F.P. Schiestl, A. Müller, O. De Castro, A.M. Nardella, A. Widmer - Proceedings of the Royal Society B 272, 2005
- [11] On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life - C. Darwin - Murray, 1859 -
- [12] On the Various Contrivances by which Orchids are Fertilised by Insects - C. Darwin - Murray, 1862 -
- [13] Orchids of Europe, North Africa and the Middle East - P. Delforge - Timber Press, 2006
- [14] What, if anything, is sympatric speciation? - B.M. Fitzpatrick, J.A. Fordyce, S. Gavrillets - Journal of Evolutionary Biology 21, 1452-1459, 2008
- [15] Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation - M.J. Hegarty, G.L. Barker, A.C. Brennan, K. J. Edwards, R.J. Abbott, S.J. Hiscock - Molecular Ecology 18, 877-889, 2009
- [16] Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium* - B.C. Husband, D.W. Schemske - Journal of Ecology 88, 689-701, 2000
- [17] Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae) - B.C.Husband, H.A.Sabara - New Phytologist 161, 703-713, 2003
- [18] Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues - D.W. Galbraith, K.R. Harkins, J.M. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma, E. Firoozabady - Science 220, No. 4601, 1049-1051, 1983
- [19] Temporal and spatial variation in flower and fruit production in a food-deceptive orchid: a five-year study - H. Jacquemyn and R. Brys - Plants Biology 12, 145-153, 2009
- [20] Evolutionary divergence among adjacent plant populations: evidence and its theoretical analysis - S.K. Jain, A. D. Bradshaw - Heredity, 21:407, 1966

- [21] Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids - J. Jersáková, S.D. Johnson, P. Kindlmann - *Biological Reviews* 81, 219-235, 2006
- [22] Absence of pollinator-mediated premating barriers in mixed-ploidy populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (Orchidaceae) - J. Jersáková, S. Castro, N. Sonk, K. Milchreit, I. Schödelbauerová, T. Tolasch, S. Dötterl - *Evolutionary Ecology* 24, 1199-1218, 2010
- [23] Pollinator driven speciation in plants - , S.D. Johnson - Pp. 295-310 in L. D Harder, and S. C. H. Barrett, eds. *Ecology and Evolution of Flowers*. Oxford Univ. Press
- [24] The Role of Animal Pollination in Plant Speciation: Integrating Ecology, Geography, and Genetics - K. M. Kay, R. D. Sargent - *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics* 40, 637-650, 2009
- [25] Metapopulation dynamics in the deceptive orchid *Anacamptis pyramidalis* - H. Lind, M. Franzen, B. Pettersson, L.A. Nilsson - *Nordic Journal of Botany* 25, 176-182, 2007
- [26] The origin of isolating mechanism in flowering plants - D.A. Levin - *Evolutionary Biology* 11, 185-317, 1978
- [27] Ecological reproductive isolation of coast and inland races on *Mimulus guttatus* - D.B. Lowry, R.C. Rockwood, J.H. Willis - *Evolution* 62-9, 2196-2214, 2008
- [28] The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants - Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. - *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363, 3009-3021, 2008
- [29] Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species - Martin and Willis - *Evolution* 61(1), 68-82, 2007
- [30] Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates - M.A. Matzke, M.F. Mette, A.J.M. Matzke - *Plant Molecular Biology* 43, 401-415, 2000
- [31] Sympatric speciation - J. Maynard Smith - *The American Naturalist*, Vol. 100, No. 916, 637-650, 1966
- [32] Ecological factors in speciation - E. Mayr - *Evolution*, Vol. 1, No. 4, 263-288, 1947

- [33] Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the mediterranean basin - F. Médail, P. Quézel - *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 84, No. 1, 112-127, 1997
- [34] On the role of Zygaenidae (Lepidoptera) in pollination of *Anacamptis pyramidalis* (Orchidaceae) - V.V. Nazarov, K. A. Efetov - *Zoologicheskii Zhurnal*, 72(10), 54-67, 1993
- [35] Polyploid incidence and evolution - S.P. Otto, J. Whitton - *Annual Review of Genetics*, Vol. 34, 401-437, 2000
- [36] Evolutionary consequences of autopolyploidy - C. Parisod, R. Holderegger, C. Brochman - *New Phytologist* 186, 5-17, 2010
- [37] A new technique for monitoring pollen flow in orchids - R. Peakall - *Oecologia*, 79(3), 361-5, 1989
- [38] *Introduzione alla filosofia della biologia* - T. Pievani - Laterza, 2005
- [39] Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines - M Pfosser, E Heberle-Bors, A Amon, T Lelley - *Cytometry*, 21, 387-394, 1995
- [40] Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants - J. Ramsey D.W. Schemske - *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 29, 467-501, 1998
- [41] Components of reproductive isolation between the monkey-flowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae) - J. Ramsey, H.D. Bradshaw Jr, D.W. Schemske - *Evolution*, 57(7), 1520-34, 2003
- [42] Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery - J. Ramsey, T.S. Ramsey - *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 369(1648), 2014
- [43] *Evolution*, 3rd Edition - M. Ridley - Wiley-Blackwell, 2003
- [44] Pollinator behaviour and plant speciation: can assortative mating and disruptive selection maintain distinct floral morphs in sympatry? - P.D. Rymer, S. D. Johnson, V. Savolainen. *New Phytologist*, 188:426-436, 2010
- [45] Ecological speciation - H.D. Rundle, P. Nosil - *Ecology Letters*, 8, 336-352, 2005
- [46] Sympatric speciation in palms on an oceanic island - V. Savolainen, M. Asntett, C. Lexer, I. Hutton, J.J. Clarkson, M.V. Norup, M.P. Powell, D. Springate, N. Salamin, W.J. Baker - *Nature*, 441, 210-213, 2006

- [47] Adaptation and The Origin of Species - Douglas W. Schemske - The American Naturalist, 176 Suppl 1:S4-S25, 2010
- [48] Patterns of Reproductive Isolation in Mediterranean Deceptive Orchids - G. Scopece, A. Musacchio, A. Widmer, S. Cozzolino - Evolution, 61(11):2623-42, 2007
- [49] Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids - G. Scopece, A. Wildmer, S. Cozzolino - The American Naturalist, 171(3), 315-26, 2008
- [50] Components of reproductive isolation *O. mascula* and *O. pauciflora* - G. Scopece, A. Croce, C. Lexer, S. Cozzolino - Evolution, 67(7), 2083-93, 2013
- [51] The ecology of adaptive radiation - D. Schluter - Oxford University Press, 2000
- [52] Ecology and the origin of species - D. Schluter - Trends in Ecology & Evolution, 16:372-380, 2001
- [53] Elementi di ecologia - T.M. Smith, R.L. Smith - Pearson, 2009
- [54] Polyploidy: recurrent formation and genome evolution - D.E. Soltis, P.S. Soltis - Tree, 14(9), 348-352, 1999
- [55] Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae) - D. Stahlberg - Evolutionary Ecology, 23. 489, 2009
- [56] Types of Polyploids: their classification and significance - G.L. Stebbins Jr - Advancements in Genetics, 1, 403-29, 1947
- [57] Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. - N. Takebayashi, P. L. Morrell - American Journal of Botany, 88:1143-1150, 2001
- [58] Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization - A. Tayalé, C. Parisod - Cytogenetic and Genome Research, 140(2-4), 79-96, 2013
- [59] Plant evolution in the Mediterranean - J.D. Thompson - Oxford University Press, 2005
- [60] Pollination activity of *Zygaena filipendulae* in *Anacamptis pyramidalis* orchid on the North Bull Island (Ireland) - E. Vallius, U. Buchsbaum, V. Nazarov - Entomofauna, 34, 27, 357-368, 2013

- [61] Ecological speciation in flowering plants - N.M. Waser, D.R. Campbell - Pp. 264-277 in U. Dieckmann, M. Doebeli, M.J. Metz, and D. Tautz, eds. Adaptive Speciation. Cambridge Univ. Press, 2004
- [62] Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids - R.J. Waterman, M.I. Bidartondo - Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 5, 1085-1096, 2008
- [63] Effects of pollination limitation and seed predation on female reproductive success of a deceptive orchid - Walsh RP, Arnold PM, Michaels H - AoB Plants, 6, plu031, 2014
- [64] Floral Isolation is the Main Reproductive Barrier Among Closely Related Sexually Deceptive Orchids - S.Xu, P.M.Schluter, G.Scopece, H.Breitkopf, K.Gross, S.Cozzolino, F.P.Scihestl - Evolution, 65(9),2606-20, 2011
- [65] Ovary and Gametophyte Development Are Coordinately Regulated by Auxin and Ethylene following Pollination - X. S. Zhang, S. D. O'Neill - The Plant Cell, 5(4), 403-418, 1993
- [66] Google Earth - <https://www.google.com/earth/>
- [67] ImageJ 1.33, Rasband - National Institute of Health, USA - <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- [68] LibreOffice 4.2 - The Document Foundation - <http://www.libreoffice.org/>
- [69] R: A Language and Environment for Statistical Computing - R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014 <http://www.R-project.org>
- [70] Rkward 0.6 - Frontend to the R statistics language (c) 2002, 2004 - 2013 - <http://rkward.sf.net>
- [71] L^AT_EX - A document preparation system - <http://latex-project.org/intro.html>
- [72] Progetto Dryades - <http://dbiodbs.units.it/>
- [73] Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee - <http://www.giros.it/>
- [74] Plotly - <https://plot.ly/>