



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di laurea in Biotecnologie Agrarie

**TESI DI LAUREA**

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI  
POPOLAZIONI DI *Robinia pseudoacacia* L. IN  
VENETO

MOLECULAR CHARACTERISATION OF  
POPULATION OF *Robinia pseudoacacia* L. FROM  
VENETO REGION

Relatore:

Prof.ssa: LUCCHIN MARGHERITA

Correlatore

Dott.ssa: SALMASO MARZIA

Laureando:

VARAGNOLO MATTIA

Matricola n. 614359-BDA

ANNO ACCADEMICO 2011 - 2012



## INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
	<b>1.1.1 Robinia</b>	<b>1</b>
	<b>1.1.2 Ecologia</b>	<b>2</b>
	<b>1.1.3 Biologia</b>	<b>3</b>
	<b>1.1.4. Moltiplicazione</b>	<b>4</b>
	<b>1.1.4.1. Moltiplicazione agamica</b>	<b>4</b>
	<b>1.1.4.2. Riproduzione gamica</b>	<b>5</b>
	<b>1.1.5. Impieghi della specie</b>	<b>6</b>
	<b>1.2.1 I marcatori molecolari</b>	<b>8</b>
	<b>1.2.2 RAPD</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>OBIETTIVO DELLA TESI</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALE E METODI</b>	<b>13</b>
	<b>3.1 Estrazione DNA vegetale</b>	<b>14</b>
	<b>3.2. Valutazione quantitativa del DNA estratto</b>	<b>15</b>
	<b>3.3. Analisi dei polimorfismi</b>	<b>16</b>
	<b>3.4. Costruzione dendrogramma</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>23</b>
	<b>4.1. Messa a punto dei protocolli sperimentali</b>	<b>23</b>
	<b>4.2. Amplificazione PCR</b>	<b>24</b>
	<b>4.3. Analisi dei dati</b>	<b>27</b>
	<b>4.4. Estensione dell'analisi a cinque popolazioni</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>35</b>



**RIASSUNTO: caratterizzazione molecolare di popolazioni di *Robinia pseudoacacia* L. in Veneto.**

La Robinia è una pianta originaria del Nord America che ha trovato in Italia un ottimo ambiente dove insediarsi e diffondersi. La specie, inizialmente coltivata per i suoi numerosi utilizzi, si è rivelata molto invasiva e ha preso il sopravvento rispetto alle diverse piante autoctone risultando infestante. Tra i motivi principali del successo della robinia a discapito delle specie locali, quali *Castanea sativa* o *Corylus avellana*, c'è la capacità di propagazione per via vegetativa che obbliga chi vuole eliminarla allo sradicamento con costi e difficoltà non sempre sostenibili. Per poter affrontare il problema è utile conoscere l'origine genetica di queste piante, se si sono riprodotte principalmente per via sessuale o asessuale e l'entità della loro diversificazione genetica che può averle aiutate nell'adattamento al clima del vecchio continente. In questo studio sono state caratterizzate mediante marcatori molecolari 3 popolazioni naturali provenienti da diverse località del Veneto con lo scopo di analizzare la variabilità genetica tra ed intra popolazione in modo da trarne utili indicazioni sulla modalità di propagazione della specie e sulla sua capacità di diffusione nell'ambiente. Per ciascuna popolazione sono state isolate quindici piante dalle quali è stato estratto il DNA per la caratterizzazione molecolare mediante marcatori RAPD.

**ABSTRACT: Molecular characterization of populations of *Robinia pseudoacacia* L. from Veneto region.**

The *Robinia* plant is from North America originally and it has found in Italy an excellent environment where to settle in and proliferate. The species, initially grown up for many uses, turned out to be very invasive and got the upper hand over several native plants, becoming a weed plant. Among the numerous reasons for the *Robinia*'s success over local species, such as *Castanea sativa* or *Corylus avellana*, is the ability of vegetative propagation: people willing to remove the *Robinia* are forced to use expensive and sometimes difficult weeding whose costs are often not sustainable. In order to handle this problem it is necessary to know the genetic origin of these plants, whether they reproduce themselves, principally through sexual or asexual way, and the entity of their genetic diversification (diversification that could have helped them in

adapting to the climate of our continent). In this study, three natural populations from different places in the Veneto region have been characterized by molecular markers: the aim is to analyze the genetic variation among and within population in order to gather information about the propagation mode and the species' ability to spread in the environment. For each population fifteen plants have been sampled and DNA has been extracted for the molecular characterization through RAPD markers.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1.1. Robinia

La robinia è una pianta originaria del Nord America e fu introdotta in Europa dal botanico francese Jean Robin. I semi di questa pianta vennero importati nel 1601, bisognò però attendere il 1635 per poterne ammirare il primo esemplare al Jardin de Paris . In onore del suddetto botanico, al servizio del re di Francia Enrico IV, Lineo denominò questa pianta robinia.



**Figura 1: Esemplare di robinia.**

Il primo esemplare fu importato in Italia nel 1662 nell'Orto Botanico di Padova (Celesti-Grappo, Pretto *et al.* 2010). Per l'utilizzo della robinia in ambito forestale bisogna attendere il diciannovesimo secolo, quando Alessandro Manzoni tentò l'impiego di questa specie nella sua villa in Brianza. L'introduzione in coltura si deve invece attribuire a Vittorio Emanuele III di Savoia. L'affermazione della robinia nel paesaggio italiano è tuttavia molto più recente, coincide infatti con la fine della seconda guerra mondiale. Venne infatti utilizzata per il rimboschimento delle zone devastate dalla guerra e quindi per il ripopolamento dei boschi (Gras 1991 in Del Favero 2004), nei terreni scoscesi per dar stabilità al suolo dove per ricavare legname erano stati

tagliati gli alberi autoctoni (Mondino e Scotta 1987 in Del Favero 2004) e nelle zone marginali dell'agricoltura per limitare la proliferazione di piante infestanti (Del Favero 2004).

La robinia appartiene alla famiglia delle *Leguminosae*, un gruppo appartenente alle dicotiledoni con oltre 700 generi e 18000 specie, secondo, per numero di specie, solo alla famiglia delle *Compositae*. Le *Leguminosae* comprendono specie arboree, erbacee e arbustive accomunate da caratteristiche comuni quali:

- Le foglie alternate sul ramo, raramente semplici, hanno la capacità di disporsi in modi diversi per meglio percepire l'energia luminosa.
- L'impollinazione è entomofila e le strutture fiorali sono quindi costruite in modo tale da facilitare la raccolta del polline da parte degli insetti.
- Il frutto, definito legume, è formato da un unico carpello deiscente (ci sono però alcune eccezioni quali le carrube che non sono indeiscenti).

Data la complessità della famiglia delle *Leguminosae* (nota anche come *Fabaceae*) molti autori preferiscono individuare tre sottofamiglie: *Caesalpinaceae*, *Mimosoideae* e *Papilionaceae*. Per Hutchinson (1969) la prima categoria raggruppa principalmente specie erbacee e corrisponde alle più evolute; le altre due categorie comprendono specie prevalentemente arbustive e arboree e più primitive (Paiero et al., 1993).

### **1.1.2. Ecologia**

La robinia è una pianta molto tollerante che riesce a sopravvivere negli ambienti più diversi di tutto il mondo. Basti pensare che dal 1971 al 1988 in Europa e Asia la superficie di piantagioni artificiali è passata da 337.000 ha a 3.264.000 ha (Keresztesi, 1983-1988). Oggi è la seconda latifolia per areale di impianto, superando i 4 milioni di ettari di coltura (Boring and Swank, 1984). Nel Nord America, dove questa leguminosa è originaria, c'è un buon tasso di precipitazioni che varia da 1000 a 1500 mm; tuttavia è stata esportata con successo in paesi con climi molto più secchi quali Cipro e Israele. Per quanto riguarda la temperatura troviamo questa pianta nei luoghi più differenti: in America sopravvive a temperature limite da +44 °C a -34 °C permettendole di diffondersi nelle montagne; in Italia Meridionale la ritroviamo fino ai 1650 metri di altitudine, in Norvegia è diffusa come pianta ornamentale. Possiamo quindi affermare che resiste bene anche al freddo dell'Europa Settentrionale necessitando però di una temperatura estiva sufficientemente elevata per permettere ai rami di lignificare e di sopravvivere all'inverno. Questa capacità di resistere alle basse temperature è dovuta principalmente a due fattori: l'ottima difesa delle gemme sotto la cicatrice fogliare e la ripresa vegetativa primaverile che avviene almeno 15 giorni dopo rispetto alle altre latifoglie (Sabo, 2000).

*Robinia pseudoacacia* L. è molto diffusa anche grazie alla sua capacità di adattamento



ai terreni più diversi: permeabili, sabbiosi, silicei, calcarei, acidi ed anche a quelli ricchi di sali di cloruri. Solo con terreni argillosi e torbosi manifesta difficoltà di crescita. Adattandosi a così tante tipologie di suoli anche il pH non è un problema, questo può variare da 4,6 a 8,2 con un optimum intorno a 6.

### 1.1.3. Biologia

I fiori della robinia compaiono nell'emisfero boreale a maggio, circa un mese dopo l'emissione delle foglie. I fiori e le gemme si trovano all'estremità dei rami. Gli organi florali maschili e femminili non si sviluppano simultaneamente in una stessa infiorescenza per cui la possibilità di autofecondazione è quasi nulla.



**Figura 2: Fiore di robinia.**

Frolova (1956), riporta per la robinia un tasso di autofecondazione basso, attorno allo 0,1 % dovuto al fatto che le antere maturano prima dell'apertura del fiore, mentre lo stigma diventa ricettivo alcuni giorni più tardi. Solo dopo che lo stigma diventa attivo, si ha la produzione del nettare necessario per il richiamo degli insetti (soprattutto api) responsabili dell'impollinazione (Peter, 1972; Haragsim, 1974; Kim *et al.*, 1986; Kim & Kim, 1987). Il frutto consiste in un baccello che si apre in autunno che però resta attaccato alla pianta per tutta la stagione invernale e, in particolari condizioni climatiche, ci possono essere due fruttificazioni per anno, se pur i semi derivanti dalla seconda sono meno germinabili. La robinia produce una buona numero di semi: da 35.000 a 77.000 semi/Kg (Olson, 1974). Questi sono molto diversi tra loro per dimensione, colore e soprattutto lunghezza del baccello in conformità a quanti grammi di seme producono le

piante. Le differenze si riscontrano tra singole piante piuttosto che tra cultivar differenti (Lazerescu, 1969).

#### **1.1.4. Moltiplicazione**

##### **1.1.4.1. Moltiplicazione agamica**

I semi sono molto coriacei, in particolare si hanno semi più resistenti che germineranno l'anno successivo e semi con tegumenti meno spessi che germinano quando le condizioni ambientali lo permettono. Normalmente la germinabilità è del 70/80 %, anche se la velocità con cui avviene la germinazione è bassa: nei primi 15-30 giorni è solo il 5 %. Ci sono molti metodi che vengono utilizzati dagli agricoltori per aumentare la germinabilità dei semi di robinia:

- Immersione in acqua tiepida per 2/3 giorni;
- immersione in acqua tiepida con latte di calce o in acqua acidulata;
- immersione in acido solforico concentrato (1 cm<sup>3</sup> per 100 semi) seguiti da lavaggi in acqua corrente e in successivi bagni con soluzioni alcaline per neutralizzare l'acidità;
- trattamenti con acqua calda o con scarificatori per indebolire il tegumento esterno e permettere lo scambio di liquidi e gas.

(Allegrì, 1941; Toda & Ishikawa, 1951; Bergann, 1954; Chirilei, 1954; Ozawa & Matsuura, 1954; Fuisz, 1957; Tompa, 1958; Lupe, 1960; Corsi, 1963; Sas, 1963; Velkow, 1970; Tarnapolsky, 1971; Brown, 1973 b; Radu & Bakos, 1973; Yacubson, 1978, Roberts & Carpenter, 1983).

La germinabilità è influenzata anche dalla temperatura: la temperatura minima è di 15 °C mentre, per avere una buona germinabilità, si deve arrivare a 20 °C (Negrutiu, 1970). In Italia infatti la semina viene condotta dopo la seconda metà di aprile per evitare le gelate a cui i semi sono molto sensibili (Allegrì, 1941).

#### **1.1.4.2. Riproduzione gamica**

La robinia è una pianta con una forte capacità pollinifera a livello radicale tale da poter propagarsi solo per via agamica. I polloni si formano da gemme dormienti sia di radici vecchie decine di anni che da radici avventizie di 1-2 anni. I polloni compaiono più frequentemente in piante di 4-5 anni di età e il loro numero aumenta esponenzialmente quando la pianta subisce un danno a livello ipogeo o epigeo (Swingle, 1937). Molto utilizzato dagli agricoltori è anche l'innesto: questo permette di indirizzare la produzione in base al tipo di talea che si va a innestare. Se interessa la produzione di legno si utilizzano talee prese dai rami più bassi o da giovani ricacci, se invece serve il fiore e il seme si utilizzano come talee porzioni vegetali prese da rami più alti.

#### **1.5. Impieghi della specie**

La robinia, grazie alle sue capacità adattative e di facile allevamento, ha molti utilizzi sia nel continente d'origine che negli altri continenti. Il principale utilizzo riguarda l'industria del legno: viene infatti largamente coltivata grazie alla sua velocità di crescita. In Ungheria, dove le condizioni di crescita sono ottime, si costruiscono robinieti con distanze d'impianto di 2x1,2x1,5 m con interfilari di altre colture erbacee (anguria o mais) per favorire la crescita in altezza ed evitare quindi le potature. Questo tipo d'impianto permette di produrre 8-12 m<sup>3</sup>/ha/anno (Keresztesi, 1988). In Francia si preferisce governare la robinia ceduandola in turni da 15 a 25 anni e a fustaia con turni di 50-60 anni. Con questa tecnica si riesce ad ottenere fino a 10 m<sup>3</sup>/ha/anno (Plaisance, 1987). In Italia possiamo riscontrare diversi tipi di impianti in base all'utilizzo del legno: turni di 3-5 anni per fascine e carbone, di 5-7 anni per pali da vigne e 12-15 anni per legna da spacco. Il robinieto così gestito solitamente è mantenuto per 80/100 anni, poi si preferisce impiantare nuovi individui. In Italia la robinia viene usata principalmente per ricavare legno da ardere con cedui ravvicinati nel tempo per velocizzare la produttività della pianta (Fassi *et al.*, 1987). Il problema del robinieto è che spesso, causa la loro vigoria, le piante prendono il sopravvento su quelle vicine soffocandole. Questo è favorito da cedui ravvicinati nel tempo. Se le piante vengono invece lasciate crescere con cedui lontani tra loro non si ha il problema delle numerose emissioni di polloni radicali (Allegri 1941; Mondino & Scotta, 1987).

A seguito una tabella per comprendere la velocità di crescita della robinia:

Età dei polloni	Accrescimento	
	In altezza	In diametro (a 10 cm dal calcio)
anni	metri	centimetri
1	1,20	1,00
2	2,10	2,50
3	3,00	3,50
4	3,70	4,50
5	4,35	5,60
6	5,00	6,70
7	5,65	8,90
8	6,25	9,60
9	6,80	10,20
10	7,25	10,80
11	7,60	11,40
12	7,95	12,00
13	8,20	12,50
14	8,40	12,90
15	8,60	13,00

**Tabella 1: (PICCOLI) L.: Selvicoltura, UTET (1923). Crescita della robinia.**

La robinia viene utilizzata anche per migliorare il terreno: appartenendo alla famiglia delle leguminose la robinia è in simbiosi radicale con un batterio del genere *Rhizobium*, con dimensioni di circa 1 $\mu$ , appartenente al gruppo dei Gram negativi, con la capacità di fissare l'azoto atmosferico, che è il maggior elemento limitante dei suoli. Si pensa che il batterio sia presente nel suolo anche in assenza del simbionte. La capacità azotofissatrice varia in base al metabolismo del microrganismo e alle condizioni ambientali: durante l'inverno può essere considerata nulla mentre il picco si ha durante l'estate se l'acqua non è limitante. Il batterio specifico per la robinia è particolarmente performante, non è infatti paragonabile agli altri microrganismi dello stesso genere in simbiosi con piante legnose, più simile invece a rizobi associati alla soia (Moiroud et al., 1981; Moiroud & CAPELLANO, 1981-1982; Stroo & Jencks, 1982; Boring & Swank, 1984; Zhou & Han, 1984; Norby, 1987).

La robinia è utilizzata inoltre per la produzione di foraggio, la composizione delle foglie è analoga a quella di Veccia e Lupinella, ma qualitativamente inferiore a quella del

trifoglio. Ci sono poi alcuni inconvenienti quali la raccolta delle foglie molto laboriosa sia per la presenza di numerose spine che per la leggerezza delle foglie che vengono facilmente trasportate dal vento. Alcuni studi (Horigome et al. 1984) indicano un basso valore nutritivo a causa dei tannini in forma libera o a complessi proteine-tannini che rendono poco digeribili le foglie dagli animali domestici. In realtà tutte le parti della robinia contengono principi attivi tossici detti "robinina" che, se ingeriti in quantità sufficiente, possono causare principi di avvelenamento, per cui si preferisce utilizzare le foglie di robinia sporadicamente e non basare la dieta degli animali sulle suddette. In particolare la robinina è attiva con proprietà agglutinanti nei confronti delle emazie dei suini, degli ovini, dei conigli e degli equini, non è invece un problema per cervi, cani, gatti e uomo (Guran, 1977; Gemelli & Merendi, 1980).

L'utilizzo che contraddistingue maggiormente l'impianto di un robinieto è probabilmente la produzione di un ottimo miele con molte qualità organolettiche (Vidano, 1986). In Ungheria, ad esempio, l'80% della produzione annua di miele è di robinia (10.000 tonnellate) (Keresztesi, 1977). L'apicoltura permette anche un guadagno indiretto aumentando esponenzialmente la produzione di frutti e semi.

Infine, dalla robinia si estraggono diverse sostanze utilizzabili dall'uomo:

- dalla corteccia si estrae un principio tintorio giallo adatto alla tintura della lana;
- dalle foglie si estrae un principio analogo a quello della corteccia che però è molto simile al blu;
- dai fiori si ricavano fragranze molto apprezzate dall'industria dei profumi;
- vengono infine preparate delle tisane con i fiori, con attività antispasmodica, astringente, e calmante (Realli, 1871; Vaultot, 1914; Gellini & Merendi, 1980; Corenich, 1981; Tocci, 1986).

Si può quindi dire che la robinia ha molteplici utilizzi, ma forse il pregio maggiore è quello di poter ricavare guadagno da tutte queste attività contemporaneamente, infatti la produzione di legna, di miele, l'utilizzo delle foglie per l'alimentazione del bestiame e l'estrazione di sostanze poi utilizzate dall'industria non sono in competizione tra loro e quindi possono fornire varie forme di reddito all'agricoltore. Data l'ampia diffusione e l'ottima capacità di accrescimento e di competizione, la robinia si è differenziata anche punto di vista genetico in risposta alla selezione naturale riposta nell'ambiente nelle diverse situazioni pedo-climatiche. Da qui la necessità di una caratterizzazione genetica dei materiali al fine di indagare l'entità e la distribuzione della variabilità genetica.

### 1.2.1. Marcatori molecolari

“ Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genetico, rilevabile con sonde (=probe) o inneschi (=primer) specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' ”(Barcaccia et al., 2000). Il genoma può essere analizzato utilizzando dei marcatori molecolari capaci di riconoscere delle diversità (mutazioni) in tratti del DNA omologhi in individui diversi però appartenenti alla stessa specie. Queste mutazioni presenti tra un individuo e l'altro a livello nucleotidico nel DNA costituiscono un insieme di marcatori genetici con la capacità di discriminare similarità o diversità con moltissima precisione. I marcatori molecolari sono quindi basati su differenze a livello nucleotidico (= polimorfismi) nel DNA di ogni individuo; quindi sono considerati come una parte del DNA cromosomico all'interno di due regioni (primer) noti. I marcatori molecolari sono molto vantaggiosi rispetto i marcatori morfologici perché non sono influenzati dall'ambiente, sono universali e in numero maggiore. I marcatori molecolari possono essere suddivisi in due sottogruppi in base alla tecnica utilizzata: alcuni come RFLP e VNTR utilizzano la tecnica dell'ibridizzazione di tipo 'Southern blot', altri come RAPD, SSR, I-SSR e AFLP sono basati sulla PCR. Questa tecnica permette di amplificare esponenzialmente il DNA utilizzando 3 fasi distinte: denaturazione, appaiamento del primer e allungamento. Le possibili applicazioni dei marcatori molecolari in ambito vegetale sono molteplici in base alla natura genetica e alla rilevanza biologica dei polimorfismi. All'interno di una specie, infatti, un individuo si diversifica dall'altro in base al numero di alleli, questo ci permette di individuare i polimorfismi (=mutazioni) nei tratti di DNA omologhi (=loci). Pur essendo il genoma vegetale molto complesso i marcatori molecolari ci permettono ugualmente di discernere informazioni sullo specifico individuo determinando il polimorfismo a livello di una sequenza cromosomica o di un gene. Attualmente i principali utilizzi dei marcatori molecolari sono:

- costruzione di mappe genetiche;
- selezione assistita;
- caratterizzazione della variabilità genetica;
- tipizzazione e identificazione varietale;
- individuazione di OGM;
- analisi di espressione genetica e clonaggio genico.

### 1.1.2 RAPD

In questo studio abbiamo utilizzato marcatori RAPD, questi fanno uso della reazione a catena della PCR scoperta da Mullis *et al.* (1986), permettendo di amplificare esponenzialmente un frammento di DNA in vitro.

I RAPD, ovvero Random Amplified of Polymorphic DNA, ovvero DNA polimorfico amplificato a caso (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990), sono marcatori molecolari multilocus (amplificano simultaneamente molti loci che derivano dall'amplificazione di tratti cromosomici con primer a sequenza casuale). Sono definiti marcatori dominanti: ad ogni locus viene evidenziata la presenza o assenza di una banda ma non è possibile distinguere la situazione di eterozigosi da quella di omozigosi dominante: l'amplificazione produce sempre e comunque una banda.

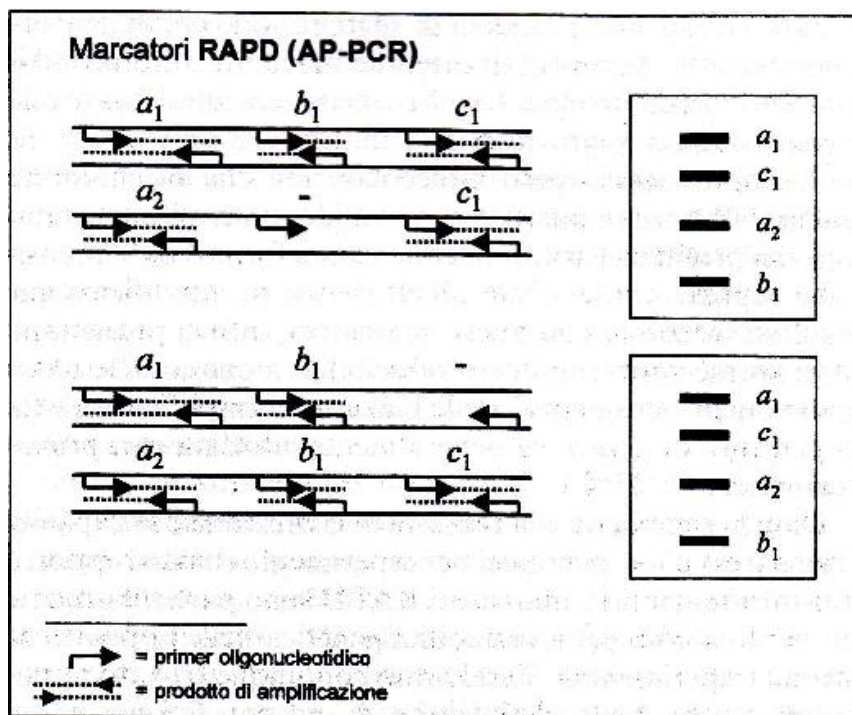


Figura 3: "Rappresentazione schematica della natura del polimorfismo multi-locus dei marcatori RAPD. I modelli di bande relativi ai 2 individui dell'esempio sono indicati anche se la condizione allelica è diversa a due dei tre loci saggiati. Infatti, i loci eterozigoti b<sub>1</sub>/- e c<sub>1</sub>/- non differiscono da quelli omozigoti b<sub>1</sub>/ b<sub>1</sub> e c<sub>1</sub>/ c<sub>1</sub> dimostrando la co- dominanza di tali marcatori. I polimorfismi possono essere dovuti a mutazioni del sito di ibridazione del primer, oppure a inserzioni o delezioni tra due siti di ibridazione" (Barcaccia *et al.*, 2000).

I RAPD si basano sull'amplificazione differenziale di specifici frammenti di DNA genomico mediante DNA polimerasi, usando come inneschi singoli nucleotidi di sequenze arbitrarie. I primer olinuclotidici hanno una lunghezza di 10 nucleotidi: essendo brevi, questi trovano numerosi siti di appaiamento e producono mediamente 6-12 polimorfismi per primer; fino ad un massimo di 20. Per massimizzare la specificità del primer questo è costituito per almeno il 60% da G+C, così da rendere più forti i legami con il DNA genomico.

I RAPD hanno numerose applicazioni:

- potendo co-segregare come i geni ed essendo ereditabili con il modello mendeliano permettono di costruire mappe geniche. Attualmente sono disponibili molte mappe geniche prodotte con marcatori RAPD sia per specie erbacee alimentari che per specie forestali. Queste vengono sempre più utilizzate per la MAS (Marker Assisted Selection ovvero selezione assistita da marcatori) che permette di selezionare individui migliori a livello genotipico, senza quindi l'influenza dell'ambiente.
- Caratterizzazione della variabilità genetica che ci permette di ricavare informazioni per quanto riguarda la diversità/similarità genetica di specie vegetali e la struttura della variabilità sia entro che tra popolazioni. C'è inoltre la possibilità di calcolare particolari coefficienti di similarità (GS) relativi all'insieme di marcatori molecolari raccolti nel gruppo di individui che a loro volta ci permettono di costruire matrici di similarità calcolando i coefficienti in tutte le possibili combinazioni a coppia tra gli individui di una o più popolazioni (Barcaccia et al., 2000).



## **2. OBIETTIVI DELLA TESI**

Come si è detto in precedenza la robinia presenta una grande capacità adattativa ed è in grado di diffondersi velocemente nell'ambiente anche grazie a diverse strategie di riproduzione e all'elevata competitività. Alla riproduzione gamica, la robinia affianca un'elevata capacità pollonifera che le permette di moltiplicarsi anche per via vegetativa. Date le caratteristiche biologiche e l'elevata capacità adattativa della specie, si ritiene che la robinia possa avere un ruolo rilevante nell'influenzare eventuali variazioni d'uso del territorio. Ciò determina l'opportunità di analizzare l'entità e la distribuzione della variabilità genetica dei popolamenti naturali/naturalizzati che si sono diffusi anche nella nostra regione occupando gli spazi incolti e, spesso, invadendo aree occupate da specie meno competitive. Scopo di questa tesi è pertanto lo studio della variabilità genetica tra e entro popolazioni di robinia di recente insediamento in diverse aree del Veneto. Dato che la diffusione della robinia determina spesso la riduzione del numero di specie della flora vascolare si vuole verificare la capacità di mantenere un'elevata variabilità genetica tra ed entro le popolazioni anche in relazione alla capacità di diffusione vegetativa tramite polloni radicali.



### 3. MATERIALE E METODI

Sono state prese in considerazione tre popolazioni naturalizzate di *Robinia pseudoacacia* L. in altrettante località del Veneto differenti per altitudine, area geografica e sviluppo del robinieto. Per scegliere le formazioni da considerare è stato utilizzato una ricerca condotta dal dipartimento Territorio e Sistemi Forestali che a sua volta ha utilizzato le ortofoto della Regione dei primi anni '80, comparandoli con quelle del 2007 in corrispondenza delle medesime aree geografiche. Sono state individuate 312 neoformazioni boschive, di cui ne sono state selezionate 32 che permettono di approfondire gli studi in campo in quanto accessibili, in aree non troppo scoscese, non in prossimità di parchi cittadini e senza pascolamento o di altre operazioni che modifichino la popolazione. Sono poi state selezionate 3 formazioni, considerando solo la *Robinia* e campionando 15 individui adulti per ciascuna popolazione. Da queste piante è stato prelevato un campione di foglie da cui successivamente è stato estratto il DNA. Per isolare la popolazione è stato collocato un quadrato di lato 10 m, per una superficie di 100 m<sup>2</sup>, tale superficie è sufficiente a contenere al suo interno i 15 individui di *Robinia* da noi considerati.

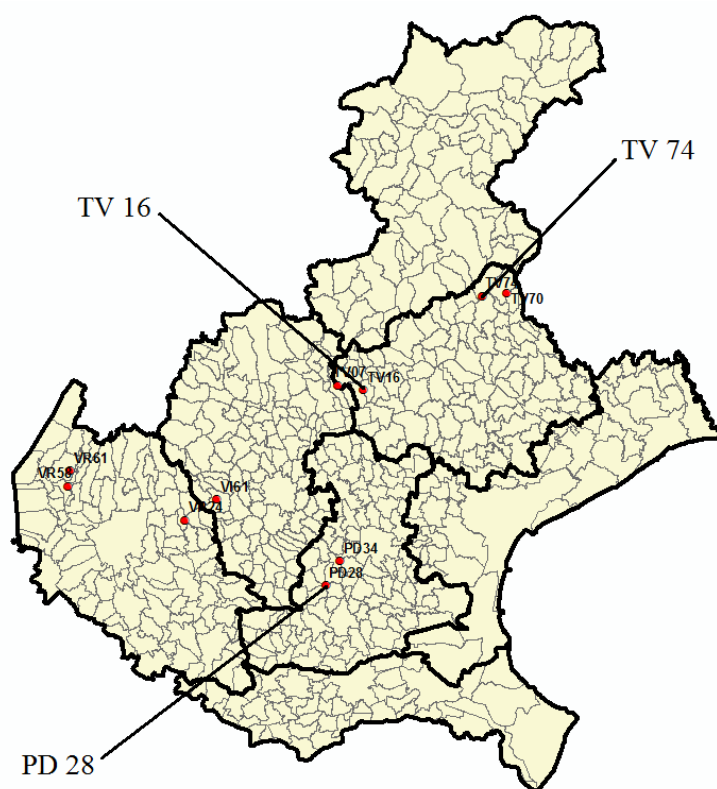


Figura 4: Cartina con indicati i tre robinieti presi in considerazione per il materiale vegetale da analizzare.

### 3.1. Estrazione DNA vegetale

L'estrazione del DNA dalle foglie è stata condotta con il kit 'Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kits' GE Healthcare Life Sciences, seguendo il protocollo qui riportato:

- Pulire il bancone con alcool per evitare contaminazioni.
- Prendere una falcon da 50 ml e mettere 4,6 ml di Buffer 1 del kit di estrazione e metterla in ghiaccio.
- Versare azoto liquido nell'apposito contenitore, prendere mortaio e pestello e versare dell'azoto dentro il mortaio per raffreddarlo.
- Nel congelatore prendere la falcon con le foglie da cui verrà estratto il DNA e metterlo nel mortaio.
- Pestellare facendo attenzione che le foglie non restino mai a temperatura ambiente, ma sempre cristallizzate grazie all'azoto.
- Quando il materiale vegetale è finemente pestellato ne verso meno di 1 gr. nel reagente 1 precedentemente messo in ghiaccio (il materiale vegetale è pesato dopo la pestellatura per essere sicuri della quantità utilizzata).
- Aggiungere 9,2 µl di RNasi concentrata 10 µg/µl.
- Mettere la falcon nel bagnetto a 37°C per 30'.
- Mettere la falcon nel sonicatore per facilitare la rottura delle pareti cellulari (circa 2').
- Aggiungere 3,2 µl di βmercaptoetanololo (sotto cappa).
- Aggiungere 1,5 ml di Buffer 2 del kit di estrazione.
- Disporre la falcon nel bagnetto a 66°C per 20' ricordandosi di mescolare ogni 4'.
- Mettere la falcon in ghiaccio per minimo 20'.
- Aggiungere 300 µl di resina presa dal kit di estrazione.
- Aggiungere sotto cappa 2 ml di cloroformio.
- Mescolare per 10 minuti.
- Centrifugare per 10 minuti a 3000 giri.
- Utilizzando una pipetta prendere solo il surnatante facendo attenzione a non toccare il pellet dove c'è il cloroformio.
- Raddoppiare il volume del liquido ottenuto con isopropanolo per far precipitare il DNA.
- Aggiungere 1 ml di etanolo al 70%.
- Centrifugare 5 minuti a 9000 giri.

- Svuotare il surnatante.
- Lasciare la falcon in ghiaccio sotto cappa per far evaporare tutto l'etanolo.
- Risospendere il DNA con acqua sterile.
- Mettere a -20°C il DNA così risospeso.

### **3.2. Valutazione quantitativa del DNA estratto**

L'elettroforesi su gel d'agarosio permette di capire approssimativamente qualità, quantità e dimensione del DNA estratto. Questa tecnica consiste nel caricare il DNA a cui è stato aggiunto il colorante blu di bromofenolo. In un gel di agarosio oltre ad utilizzare il DNA, si carica anche un marcatore di peso molecolare. Il gel viene fatto correre a 90 V e 130 A per 45'. Il DNA è carico negativamente a causa dei gruppi fosfati presenti in ogni molecola, così migra verso il polo positivo (l'anodo) nella parte opposta ai pozzetti.

La maglia del gel, grazie alla corrente elettrica, distribuisce i frammenti di DNA in base alle loro dimensioni: i più grandi vicino alla porzione superiore del gel mentre i più leggeri verso la porzione inferiore.

Terminata la corsa elettroforetica, il gel viene esaminato agli ultravioletti e i frammenti di DNA vengono comparati con quelli del marcatore 1 Kb plus (Invitrogen).

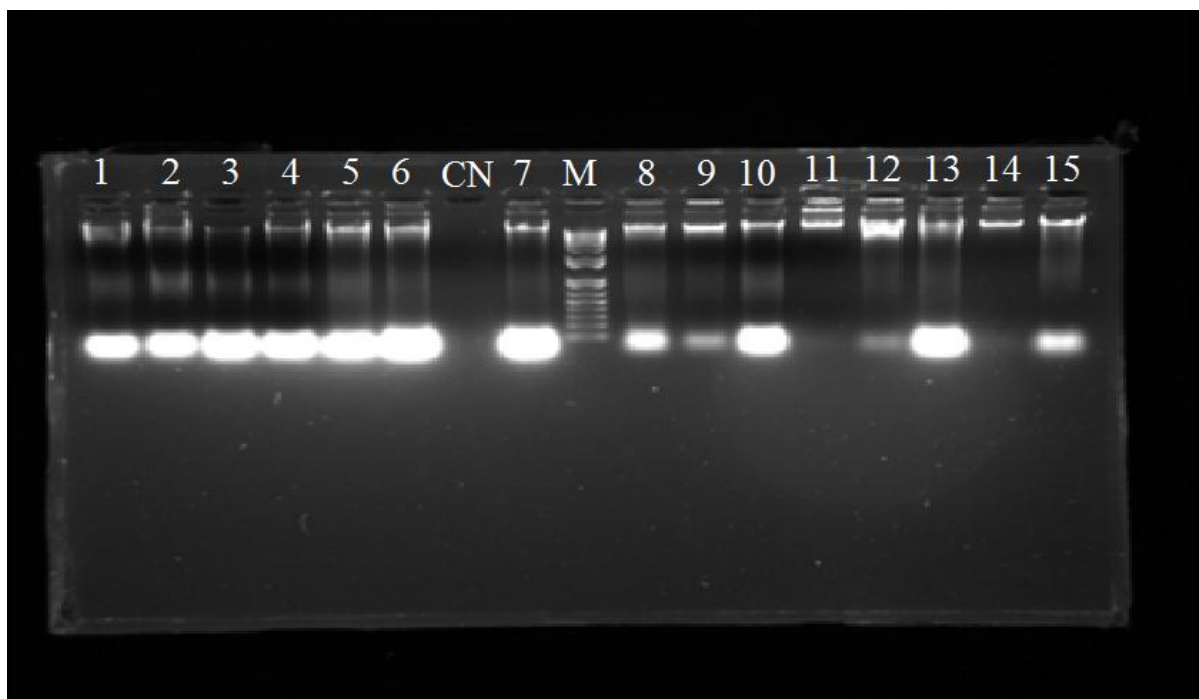
Il TAE è il solvente utilizzato per fare i gel di agarosio e viene così fatto:

Mettere in un becker da 1000ml:

- 242 g di tris base
- 57,1 ml di acido acetico (sotto cappa)
- 100 ml EDTA (0,5M)
- portare il volume a 1000 ml con acqua deionizzata
- autoclavare per rendere sterile la soluzione

Il gel di agarosio viene fatto in questo modo:

- Pesare la quantità di agarosio all'1% rispetto alla quantità di gel che si vuole ottenere
- aggiungere TAE 1X pari al volume del gel di agarosio che si vuole ottenere
- aggiungere l'agente intercalante (Syber safe) al DNA
- portare a ebollizione in microonde
- versare nella vaschetta con i pettini per la corsa elettroforetica e lasciare polimerizzare per 30' circa
- mettere il gel nella vasca per corsa elettroforetica e caricare i campioni



**Figura 5: Esempio di corsa elettroforetica per verificare l'estrazione di DNA.**

**M: marker 1 Kb plus (Invitrogen).**

**CN: controllo negativo.**

**1-15: campioni di DNA vegetale.**

### **3.3. Analisi dei polimorfismi**

L'analisi è stata condotta mediante marcatori molecolari di tipo RAPD che prevedono l'amplificazione selettiva di specifici frammenti, la loro separazione elettroforetica e la successiva analisi prodotta. Estratto il DNA da tutti i campioni sono state fatte le PCR. La Reazione a Catena della Polimerasi, è una tecnica che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di replicazione del DNA dell'

enzima DNA polimerasi. Nelle reazioni di PCR utilizziamo la taq polimerasi di *Thermus aquaticus*, un batterio scoperto negli anni '80 nel parco di Yellowstone in USA. Questo particolare tipo di enzima ha capacità di resistere a temperature proibitive per le normali taq polimerasi (94-95°C), così facendo il processo di amplificazione è stato rivoluzionato grazie alla costruzione di termociclatori che rendono oggi l'amplificazione rapida e automatizzabile. L'amplificazione è innescata da *primers* che trovano complementarietà nei due filamenti di DNA stampo.

La PCR è composta di tre fasi:

- Denaturation:** fase di denaturazione della doppia elica di DNA a 95 °C
- Annealing:** fase in cui i *primers* si appaiano alle due estremità del frammento da amplificare. Normalmente viene condotta a 57° C
- Extension:** fase in cui la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA a 72° C, a questa temperatura la taq polimerasi ha l'optimum di attività.

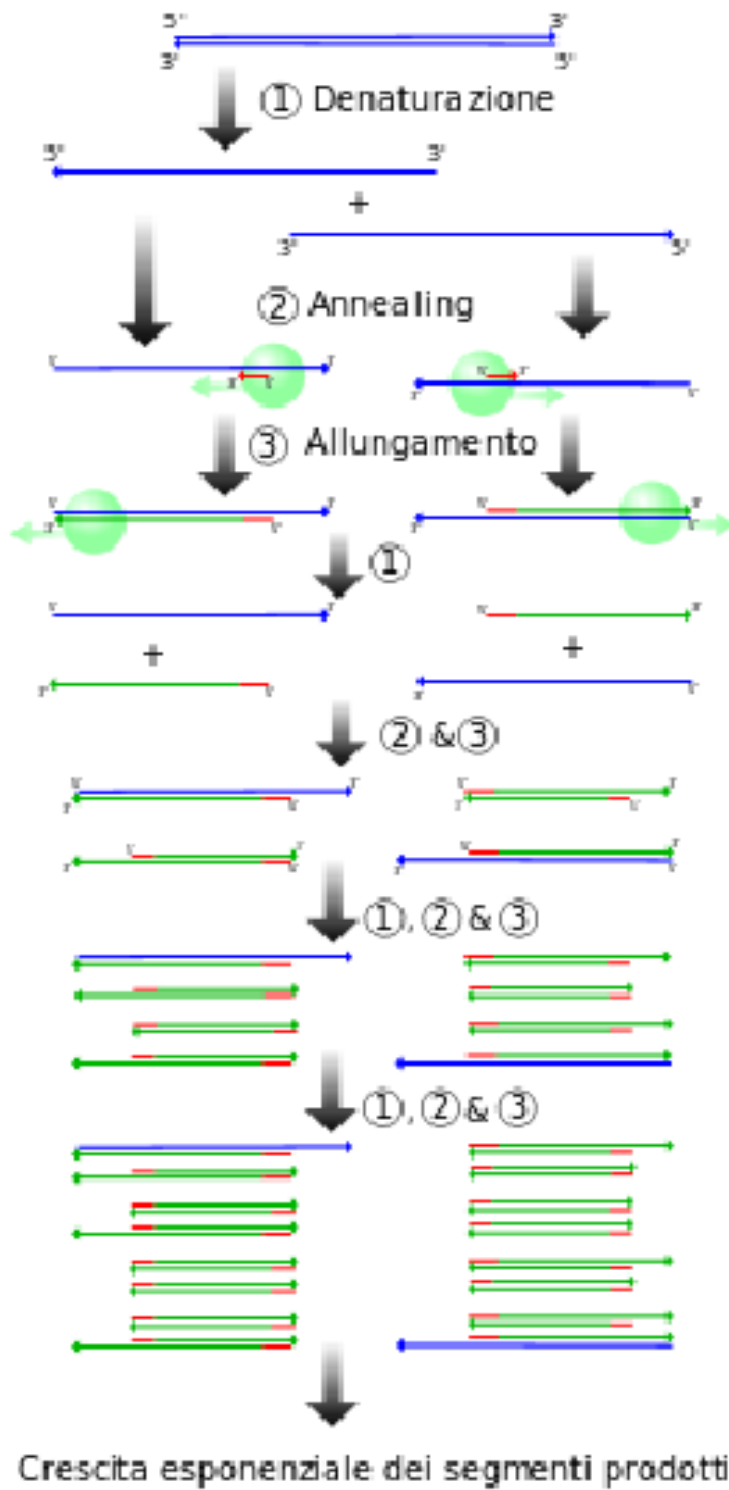


Figura 6: Schema di un'amplificazione PCR.

Solitamente la PCR viene condotta per circa 30 cicli, alla fine dei quali normalmente si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra i due *primer*.



Nel caso specifico per i RAPD la PCR è stata così impostata:

N° CICLI	FASE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min)
-	Denaturazione iniziale	94	5
3	Denaturazione	94	2
	Attacco primer	35	1
	Sintesi nuovi filamenti	72	2
35	Denaturazione	94	1
	Attacco primer	35	1
	Sintesi nuovi filamenti	72	2
-	Estensione finale	72	20
-	Raffreddamento	4	∞

**Tabella 2: fasi di PCR**

Il mix tipico di una reazione di PCR è composto da:

- Buffer di reazione: specifico per ogni enzima e un mix di sali e ha la funzione di mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq.
- MgCl<sub>2</sub>: lo ione Mg<sup>2+</sup> è un cofattore necessario per il corretto funzionamento della polimerasi, inoltre influenza la specificità dei *primers* e favorisce l'inserimento dei dNTP's. È importante dosare correttamente la quantità di Mg<sup>2+</sup> in quanto un eccesso di questo cofattore rende molto aspecifica l'attività della polimerasi.
- dNTPs: sono i mattoni da costruzione per la sintesi del filamento di DNA.
- Primers* Forward e Reverse.
- Taq DNA polimerasi.
- Additivi per PCR: sono sostanze eterogenee per natura (Bio Stab, Betaine, etc) con la comune capacità di destabilizzare i filamenti del DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC che tendono a formare strutture secondarie molto stabili o rendendo più specifico l'attacco dei *primers*.

La composizione da noi utilizzata è:

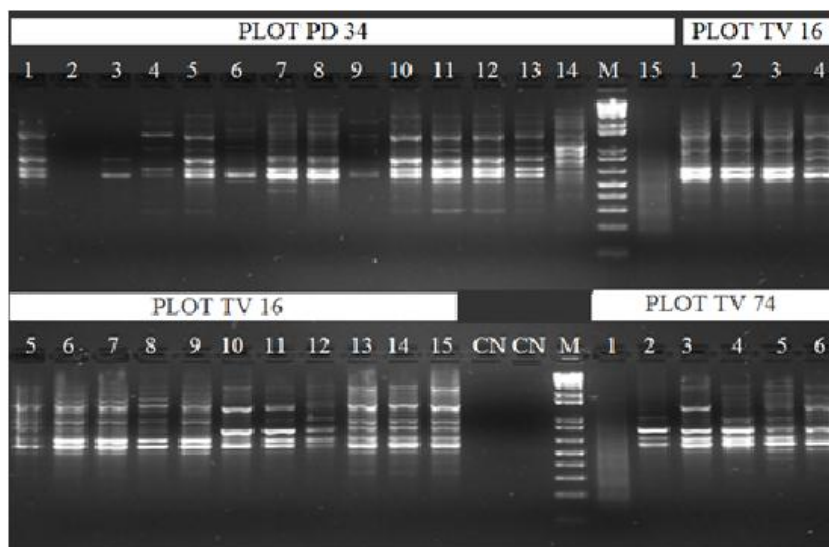
MIX	VOLUME (25µL)
H <sub>2</sub> O sterile	8 µl
Buffer 10X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,7 µl
Primers(10µM)	5 µl
dNTPs (10 µM)	2,5 µl
Taq polimerasi (5U/µl)	0,3 µl
DNA stampo	5 µl

**Tabella 3: mix per PCR.**

I Primer utilizzati per produrre i polimorfismi sono i seguenti:

Primer name	Primer sequences (5'-3')
312	ACGGCGTCAC
315	GGTCTCCCTAG
318	CGGAGAGCGA
324	ACAGGGAACG
P2	TCGGCACGCA

**Tabella 4:Primer utilizzati per RAPD.**



**Figura 7: Esempio di gel con marcatori RAPD con primer 312.**

**M: marker 1 Kb plus (Invitrogen).**

**CN: controllo negativo.**

**F: DNA di fagiolo.**

**1-15: campioni di DNA vegetale.**

### **3.4. Costruzione dendrogramma**

Il dendrogramma è uno strumento che ci permette di visualizzare graficamente la similarità genetica, calcolata dalle matrici di similarità, tra individui diversi. Con questo strumento riusciamo a discernere se gli individui sono cloni, se hanno un'origine comune o se sono filogeneticamente distanti (sono stati utilizzati come outgroup campioni di DNA di *V. vinifera* e di *Phaseolus vulgaris*). Per la costruzione dell'albero filogenetico è stato utilizzato il programma Ntsys (Exeter software versione 2.1): questo permette di elaborare i dati numerici e trasformarli dopo una serie di passaggi in forma grafica sulla base della similarità genetica tra coppie di individui utilizzando l'indice di similarità Dice:

$$GS_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Dove:

- a: numero di marcatori comuni della coppia di individui i e j considerati
- b: il numero di marcatori presenti in j ed assenti in i
- c: il numero dei marcatori presenti in i ed assenti in j

L'indice di Dice varia da 0 a 1, dove 1 sta ad indicare individui geneticamente identici e viceversa 0 individui geneticamente diversi.



## 4. RISULTATI

### 4.1. Messa a punto dei protocolli sperimentali

Dopo aver verificato la qualità del DNA estratto da tutti i campioni, è stato necessario procedere innanzi tutto all'individuazione delle concentrazioni del DNA ottimale per la Reazione a catena della polimerasi. Abbiamo quindi cercato le diluizioni di DNA che consentivano il miglior risultato dell'amplificazione con i primer selezionati. Per il campione di DNA di ogni plot sono state saggiate 6 diluizioni con acqua sterile:

1:10

1:100

1:200

1:500

1:1000

1:2000

Ogni DNA amplifica con una diluizione differente, di seguito una tabella dove sono indicate le diluizioni risultanti migliori per ogni campione:

CAMPIONE	DILUIZIONE	CAMPIONE	DILUIZIONE	CAMPIONE	DILUIZIONE
PD28 1	1:10	TV16 1	1:10	TV74 1	1:2000
PD28 2	1:100	TV16 2	1:10	TV74 2	1:200
PD28 3	1:500	TV16 3	1:200	TV74 3	1:200
PD28 4	1:100	TV16 4	1:1000	TV74 4	1:500
PD28 5	1:100	TV16 5	1:500	TV74 5	1:500
PD28 6	1:500	TV16 6	1:500	TV74 6	1:200
PD28 7	1:200	TV16 7	1:2000	TV74 7	1:100
PD28 8	1:500	TV16 8	1:100	TV74 8	1:1000
PD28 9	1:100	TV16 9	1:200	TV74 9	1:500
PD28 10	1:2000	TV16 10	1:10	TV74 10	1:200
PD28 11	1:200	TV16 11	1:200	TV74 11	1:2000
PD28 12	1:500	TV16 12	1:200	TV74 12	1:10
PD28 13	1:100	TV16 13	1:1000	TV74 13	1:500
PD28 14	1:100	TV16 14	1:1000	TV74 14	1:500
PD28 15	1:200	TV16 15	1:100	TV74 15	1:2000

**Tabella 5: elenco delle diluizioni ottimali per ogni campione di DNA, utilizzate nelle successive amplificazioni PCR.**

Da questa tabella vediamo come non ci sia uniformità per quanto riguarda le diluizioni

utilizzate, infatti i primer non amplificano meglio ad una stessa diluizione per tutti i campioni all'interno della medesima popolazione, ma la diluizione è differente con variazioni da 1:10 a 1:2000. Questo può essere dovuto al diverso stato di conservazione del materiale vegetale e quindi alla qualità del DNA estratto oltre che alla quantità.

## 4.2. Amplificazione PCR

I prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione con i primer riportati in tabella sono stati separati in gel di agarosio per la rilevazione dei polimorfismi.

Complessivamente sono stati individuati 56 loci polimorfici e i primer utilizzati hanno evidenziato un diverso potere discriminante. Nel particolare: il primer 324 ha messo in evidenza ben 21 loci, il primer 312 10, il primer 318 9 e i primer 315 e P2 8. I dati dei prodotti di amplificazione sono stati inseriti in una matrice a due entrate dove il numero 1 indica la presenza della banda, lo 0 l'assenza, il 9 l'incertezza nella lettura del dato. La matrice binaria dei dati di presenza/assenza delle bande a ciascun locus è stata utilizzata per il calcolo dei coefficienti di similarità genetica (GS). Tali coefficienti permettono infatti di caratterizzare la variabilità genetica attraverso la definizione di matrici di similarità costruite calcolando i coefficienti relativi in tutte le possibili combinazioni a coppia tra tutti gli individui di una popolazione e tra più popolazioni. Di seguito le matrici di similarità genetica:

1 PD28	1															
2 PD28	0,98039	1														
3 PD28	0,98039	1	1													
4 PD28	0,98039	1	1	1												
5 PD28	0,98039	1	1	1	1											
6 PD28	0,98039	1	1	1	1	1										
7 PD28	0,875	0,89362	0,89362	0,89362	0,89362	0,89362	0,89362	1								
8 PD28	0,98039	1	1	1	1	1	0,89362	1								
9 PD28	0,98039	1	1	1	1	1	0,89362	1	1							
10 PD28	0,96154	0,98039	0,98039	0,98039	0,98039	0,98039	0,875	0,98039	0,98039	1						
11 PD28	0,98039	1	1	1	1	1	0,89362	1	1	0,98039	1					
12 PD28	0,98039	1	1	1	1	1	0,89362	1	1	0,98039	1	1				
13 PD28	0,82353	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,95833	0,84	0,84	0,82353	0,84	0,84	1			
14 PD28	0,80952	0,78049	0,78049	0,78049	0,78049	0,78049	0,82051	0,78049	0,78049	0,7619	0,78049	0,78049	0,78049	1		
15 PD28	0,8	0,81633	0,81633	0,81633	0,81633	0,81633	0,80851	0,81633	0,81633	0,84	0,81633	0,81633	0,77551	0,8	1	
	1 PD 28	2 PD 28	3 PD 28	4 PD 28	5 PD 28	6 PD 28	7 PD 28	8 PD 28	9 PD 28	10 PD 28	11 PD 28	12 PD 28	13 PD 28	14 PD 28	15 PD 28	

Tabella 6: matrice dei coefficienti di similarità entro popolazione del plot PD28.

La similarità genetica della popolazione PD28 è del 92,00 %.

1 TV74	1															
2 TV74	0,91892	1														
3 TV74	0,78049	0,86486	1													
4 TV74	0,71795	0,78947	0,7907	1												
5 TV74	0,66667	0,74286	0,75	0,91892	1											
6 TV74	0,76923	0,72222	0,8	0,5641	0,59459	1										
7 TV74	0,7907	0,82927	0,86957	0,69565	0,69767	0,86364	1									
8 TV74	0,7619	0,78947	0,86364	0,69767	0,75	0,78049	0,82609	1								
9 TV74	0,82051	0,8	0,87805	0,75	0,75676	0,76923	0,81818	0,83721	1							
10 TV74	0,80952	0,8	0,84444	0,77273	0,78049	0,85714	0,875	0,82609	0,88372	1						
11 TV74	0,73684	0,78947	0,82927	0,68293	0,68421	0,84211	0,80851	0,71429	0,8	0,81818	1					
12 TV74	0,6	0,7027	0,80952	0,66667	0,66667	0,63415	0,85106	0,69767	0,73171	0,66667	0,69767	1				
13 TV74	0,77273	0,8	0,91304	0,69565	0,69767	0,75556	0,86275	0,85106	0,88889	0,77551	0,78261	0,83333	1			
14 TV74	0,74419	0,76923	0,88889	0,66667	0,66667	0,7907	0,88	0,78261	0,88889	0,83333	0,88889	0,76596	0,86275	1		
15 TV74	0,7619	0,81081	0,93333	0,69767	0,65	0,90476	0,89362	0,75556	0,7907	0,86957	0,86364	0,72727	0,83333	0,89362	1	
1 TV74	2 TV74	3 TV74	4 TV74	5 TV74	6 TV74	7 TV74	8 TV74	9 TV74	10 TV74	11 TV74	12 TV74	13 TV74	14 TV74	15 TV74		

**Tabella 7: matrice dei coefficienti di similarità entro popolazione del plot TV74.**

La similarità genetica della popolazione TV74 è del 78,43 %.

1 TV16	1															
2 TV16	0,875	1														
3 TV16	0,86486	0,8	1													
4 TV16	0,82353	0,81081	0,80952	1												
5 TV16	0,75	0,77778	0,75	0,91892	1											
6 TV16	0,77778	0,78049	0,81818	0,80952	0,7	1										
7 TV16	0,72727	0,68421	0,73171	0,84211	0,81081	0,82927	1									
8 TV16	0,83333	0,82051	0,88372	0,82927	0,87179	0,7619	0,76923	1								
9 TV16	0,72222	0,8	0,74419	0,87805	0,87179	0,81818	0,85	0,82927	1							
10 TV16	0,78571	0,78788	0,8	0,74286	0,78788	0,8	0,76471	0,82353	0,70588	1						
11 TV16	0,75676	0,78049	0,77273	0,82927	0,82927	0,75556	0,80952	0,7907	0,77273	0,77778	1					
12 TV16	0,75676	0,78049	0,77273	0,87805	0,82927	0,75556	0,80952	0,74419	0,81818	0,75676	0,95652	1				
13 TV16	0,84848	0,77778	0,9	0,86486	0,82353	0,82051	0,83333	0,82051	0,75676	0,82353	0,78947	0,84211	1			
14 TV16	0,74286	0,76923	0,7619	0,87179	0,84211	0,71429	0,76923	0,78049	0,78049	0,77778	0,7907	0,83721	0,88889	1		
15 TV16	0,75	0,6875	0,72222	0,85714	0,70968	0,77778	0,78788	0,66667	0,74286	0,66667	0,72222	0,77778	0,83871	0,82353	1	
1 TV16	2 TV16	3 TV16	4 TV16	5 TV16	6 TV16	7 TV16	8 TV16	9 TV16	10 TV16	11 TV16	12 TV16	13 TV16	14 TV16	15 TV16		

**Tabella 8: matrice dei coefficienti di similarità entro popolazione del plot TV16.**

La similarità genetica della popolazione TV16 è del 79,49 %.

Le due popolazioni campionate nella provincia di Treviso, seppure spazialmente lontane, mostrano un'analogia variabilità genetica entro popolazione, nettamente più contenuta di quella rilevata nella popolazione dei Colli Euganei.

Di seguito la matrice di similarità genetica tra tutti gli individui delle tre popolazioni nei confronti dei outgroups fagiolo(F) e vite(V1):

	F	V1		F	V1		F	V1
1 PD28	0,38298	0,4	1 TV74	0,43902	0,40909	1 TV16	0,36842	0,35
2 PD28	0,38298	0,40816	2 TV74	0,32432	0,4186	2 TV16	0,35897	0,28571
3 PD28	0,38298	0,40816	3 TV74	0,4186	0,4	3 TV16	0,36364	0,35556
4 PD28	0,38298	0,40816	4 TV74	0,29268	0,36364	4 TV16	0,34146	0,44444
5 PD28	0,38298	0,40816	5 TV74	0,30769	0,34146	5 TV16	0,35897	0,45455
6 PD28	0,38298	0,40816	6 TV74	0,43902	0,31818	6 TV16	0,33333	0,4
7 PD28	0,4	0,42553	7 TV74	0,46809	0,375	7 TV16	0,30769	0,38095
8 PD28	0,38298	0,40816	8 TV74	0,44444	0,3913	8 TV16	0,42857	0,40909
9 PD28	0,38298	0,40816	9 TV74	0,47619	0,36364	9 TV16	0,38095	0,4
10 PD28	0,375	0,4	10 TV74	0,48889	0,33333	10 TV16	0,35294	0,26316
11 PD28	0,38298	0,40816	11 TV74	0,39024	0,36364	11 TV16	0,40909	0,38298
12 PD28	0,38298	0,40816	12 TV74	0,35556	0,34783	12 TV16	0,36364	0,38298
13 PD28	0,42553	0,40816	13 TV74	0,45833	0,4	13 TV16	0,30769	0,35
14 PD28	0,42105	0,29268	14 TV74	0,47826	0,36735	14 TV16	0,38095	0,31818
15 PD28	0,43478	0,375	15 TV74	0,45455	0,34043	15 TV16	0,32432	0,4

**Tabella 9: matrice dei coefficienti di similarità di *Phaseolus vulgaris* e *Vitis vinifera* nei confronti dei campioni di *Robinia pseudoacacia* L.**

Di seguito gli indici di similarità tra popolazioni:

PD28 vs TV16	PD28 vs TV74	TV16 vs TV74
0,763456	0,77327	0,766635

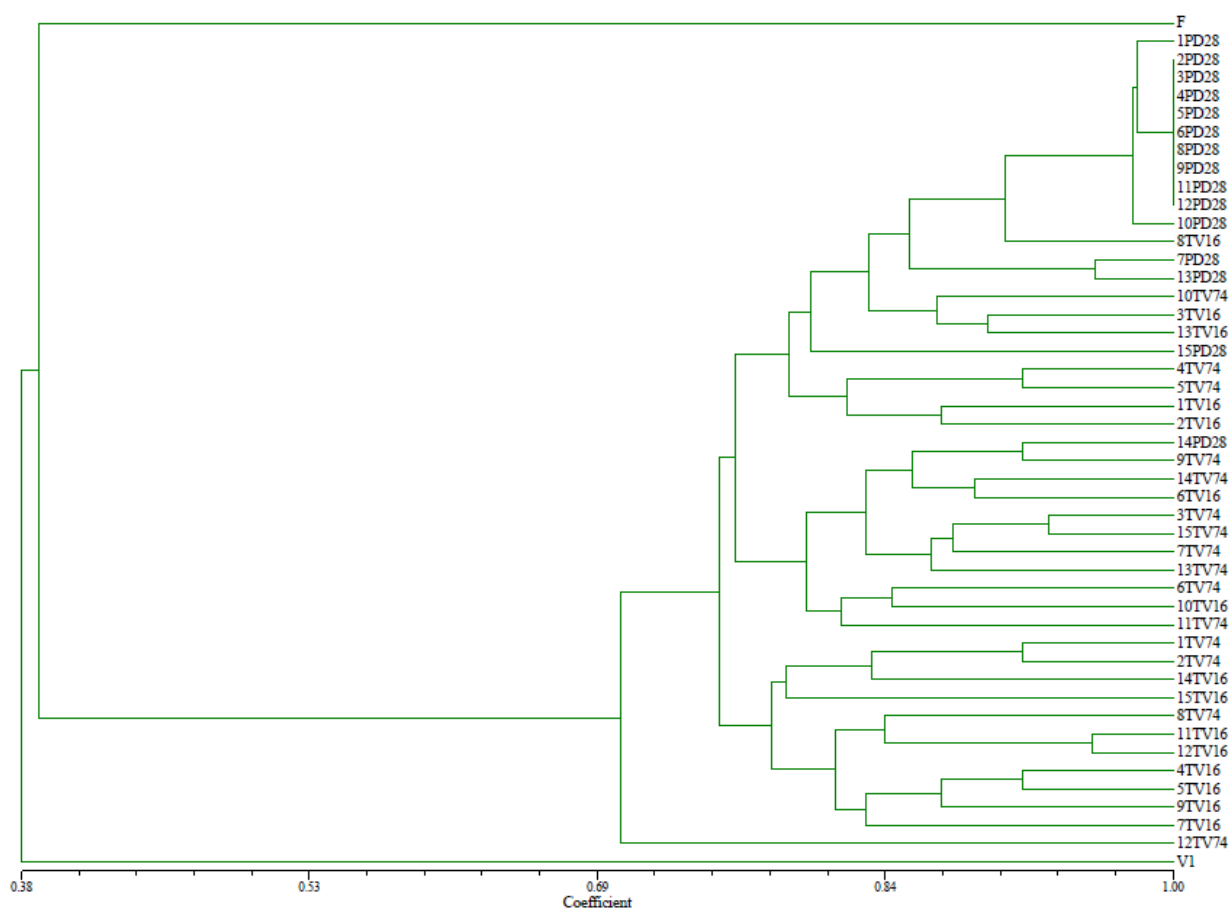
**Tabella 10: indici di similarità tra popolazioni.**

Da questo confronto non emergono indicazioni a supporto di un'eventuale differenziazione tra le popolazioni e i valori di SG tra popolazioni risultano di poco inferiori a quelle osservate entro le popolazioni stesse.



### 4.3. Analisi dei dati

L'analisi di raggruppamento condotta utilizzando la matrice di similarità complessiva con tutti i 45 individui analizzati calcolata sulla base dei marcatori polimorfici e monomorfici ha portato alla costruzione del dendrogramma riportato in figura 8. I 2 campioni outgroups *Phaseolus vulgaris* e *Vitis vinifera* confermano una similarità genetica molto bassa nei confronti della robinia. In particolare il fagiolo è più simile agli individui di robinia con un indice di SG del 39,00 % rispetto a quello della vite che è del 38,00 %. Questo è ciò che mi aspettavo essendo il fagiolo filogeneticamente più simile alla robinia, in quanto appartengono entrambi alla famiglia delle Leguminose. All'interno del dendrogramma si possono individuare 3 sottogruppi. Nel primo troviamo quasi esclusivamente gli individui della popolazione situata nel padovano, nel particolare ci sono: 14 campioni della popolazione PD28, 5 appartenenti alla popolazione TV16 e 3 alla TV74. In questo gruppo è importante evidenziare la presenza di ben 9 individui geneticamente identici (tutti appartenenti al gruppo PD28) indicando chiaramente un'origine da propagazione vegetativa. Oltre a questi 9 se ne possono considerare altri 2 appartenenti alla medesima popolazione con una similarità totale del 98,00 %. E' grazie a questi individui molto simili tra loro che la similarità genetica all'interno della popolazione PD28 risulta essere del 92,00 %. Nel secondo gruppo troviamo 8 individui appartenenti alla popolazione TV74, 2 appartenenti alla popolazione TV16 e l'unico individuo della popolazione PD28 che non ricadeva nel primo gruppo. Nell'ultimo gruppo ritroviamo invece 8 piante appartenenti alla popolazione TV16 e 3 alla TV74. Negli ultimi due gruppi non sono presenti piante geneticamente identiche, quindi si può affermare che tutte le piante derivano da riproduzione sessuale e non da propagazione vegetativa. Seppur divisi in 3 gruppi, la SG media tra tutte le 45 piante di robinia analizzate risulta pari al 76,77 %, dato normale per individui appartenenti alla stessa specie. E' interessante notare l'individuo 12 TV74, che si colloca al di fuori dei tre sottogruppi prima identificati e mostra una SG media con gli altri individui pari al 69,40%. Il dato può essere dovuto a molteplici motivi: l'individuo può essere stato generato da 2 piante molto diverse da quelle prese in considerazione e quindi avere un indice di similarità inferiore rispetto al resto dei campioni analizzati o più semplicemente il materiale da cui è stato estratto il DNA era in cattive condizioni fitosanitarie e questo potrebbe aver inciso sui risultati dell'amplificazione PCR, quindi sui dati di similarità.



**Figura 8: dendrogramma relativo ai plot PD 28, TV 16 e TV 74.**

#### **4.4. Estensione dell'analisi a cinque popolazioni**

Questa tesi è stata condotta in parallelo con un analogo lavoro che ha riguardato ulteriori due popolazioni di robinia campionate nelle provincie di Treviso e Vicenza e analizzate con gli stessi primer RAPD. Si è quindi ritenuto opportuno condurre un'analisi completa di tutti i 75 campioni considerando l'albero filogenetico complessivo. In quest'analisi sono state pertanto incluse ulteriori 2 popolazioni di robinia del Veneto, denominate TV 07 e PD 34. Anche in questo caso vediamo come fagiolo (indicato con F) e vite (indicata con V) risultino geneticamente distanti da tutti gli individui di robinia. E' possibile notare come anche tra gli individui appartenenti alla popolazione PD34 siano presenti diversi cloni come già osservato per la popolazione PD28 (entrambi queste popolazioni sono ubicate nel padovano nell'area dei Colli Euganei). Si può ipotizzare che le condizioni pedoclimatiche di queste stazioni inducano maggiormente la moltiplicazione vegetativa, sfavorendo la riproduzione via seme, e quindi la riproduzione sessuale. Per quanto riguarda gli altri individui sono

sicuramente frutto di ricombinazione, ad eccezione dei soli individui 1 TV07 e 2 TV07 che hanno indice di similarità pari al 100 %.

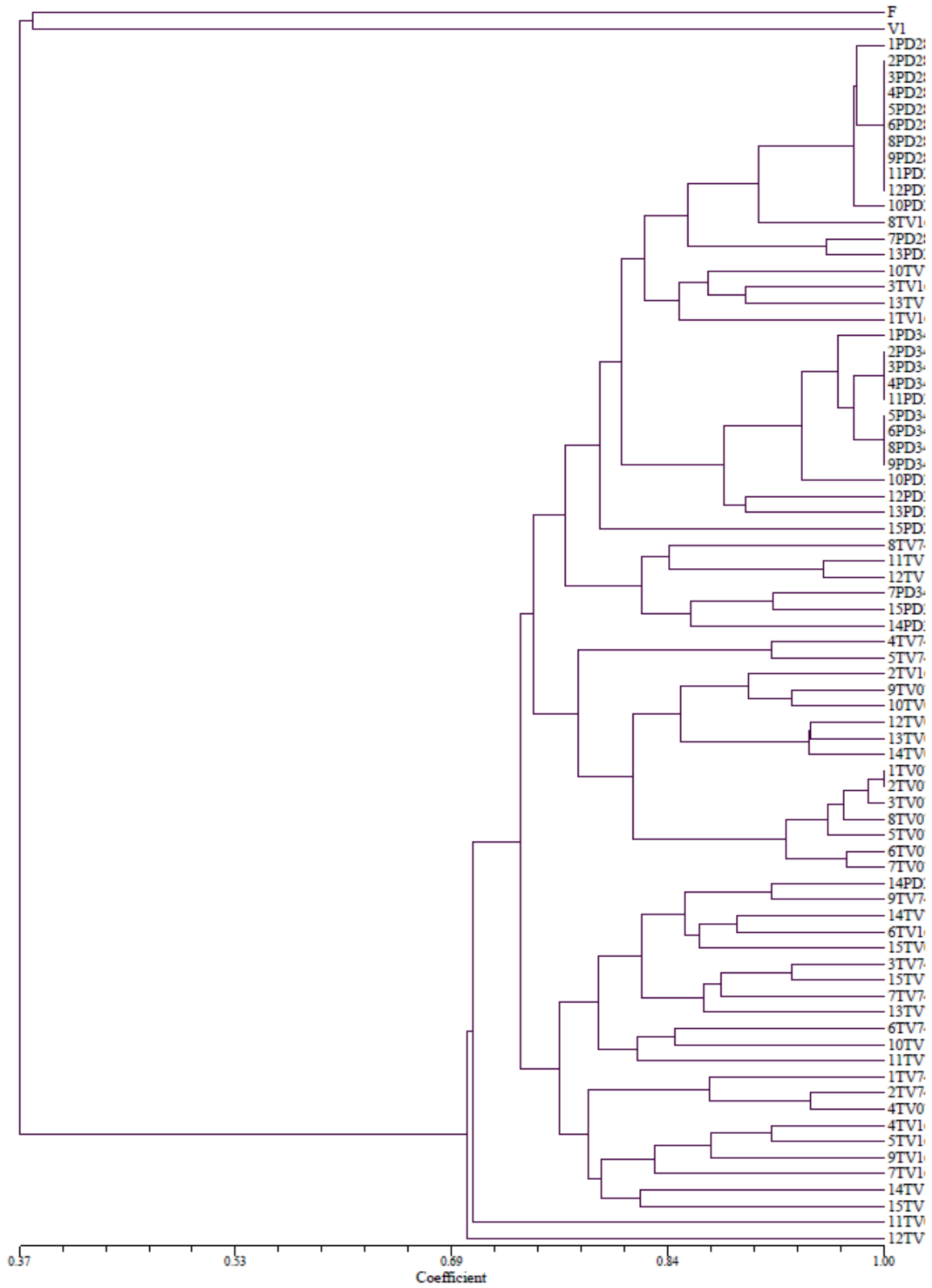


Figura 9: dendrogramma relativo ai plot PD28, TV16 , TV74, TV07 e PD34.



## 5. CONCLUSIONI

Dall'osservazione del dendrogramma riportato in figura 8, si nota subito che gli outgroups *Phaseolus vulgaris* e *Vitis vinifera* hanno una similarità molto bassa rispetto alle piante che appartengono invece a *Robinia pseudoacacia*. Questa può essere considerata come una prova che la sperimentazione ha avuto esito positivo e che i marcatori RAPD sono stati eseguiti adeguatamente. In particolare la similarità genetica, basata sull'indice DICE tra *Phaseolus vulgaris*, *Vitis vinifera* e *Robinia pseudoacacia* è del 38,00 %. La similarità tra le piante di robinia delle diverse popolazioni del Veneto è invece molto più elevata arrivando ad un valore medio del 71,00 %. La popolazione PD 28 si trova nell'area dei Colli Euganei, in provincia di Padova ed è il più uniforme arrivando ad una similarità genetica entro popolazione del 92,00 %. Questo dato si spiega anche sulla base del fatto che ben 9 campioni su 15 sono risultati geneticamente identici e quindi derivanti da propagazione vegetativa. Questo può essere dovuto principalmente a due motivi: condizioni ambientali, danneggiamenti accidentali per causa antropica o naturale che hanno favorito la proliferazione agamica rispetto alla riproduzione gamica o per il modo in cui è stato campionato il robinieto: gli individui sono stati considerati all'interno di un'area di 100 m<sup>2</sup>, zona alquanto esigua dove è possibile trovare individui generati per propagazione vegetativa. Dei restanti sei individui due mostrano una similarità genetica del 98,00 % con i nove individui geneticamente identici, gli altri quattro invece hanno similarità genetica molto inferiore; in particolare il campione 14 PD28 ha una similarità genetica nei confronti degli altri individui della medesima popolazione pari a 78,37 %.

Gli altri 2 popolamenti considerati, TV16 e TV74, sono situati entrambi all'interno della provincia di Treviso; in particolare TV74 al confine con la provincia di Belluno mentre la popolazione TV16 al confine con la provincia di Vicenza. Tra questi individui non è possibile individuare piante geneticamente identiche che ci lascino pensare a riproduzioni per via asessuale. Presupponiamo quindi che per questi due popolamenti la riproduzione sia avvenuta sessualmente quindi ricombinando il genoma dei vari individui. Questa osservazione è supportata anche dal fatto che per queste due popolazioni è stato necessario ampliare l'area di campionamento a causa della scabrosità del terreno e dallo scarso numero di individui di *Robinia pseudocacia* entro il perimetro di 100 m<sup>2</sup>. Importante è sicuramente la diversità delle condizioni ambientali dei siti di raccolta del materiale: probabilmente le condizioni pedoclimatiche dell'area

dei Colli Euganei hanno permesso un rimboschimento più denso del robinieto rispetto a quelle del trevigiano promuovendo quindi la propagazione per via vegetativa. Va comunque sottolineato che questi risultati ottenuti su una specie scarsamente studiata dal punto di vista genetico dovranno essere consolidati anche utilizzando dei marcatori di tipo co-dominante capaci di fornire indicazioni più precise sul grado di differenziazione tra popolazioni. Infine sarà opportuno integrare i risultati della caratterizzazione genetica dei materiali con quelli ecologici delle stazioni di provenienza del materiale.

## **RINGRAZIMENTI**

Ringrazio tutte le persone che mi hanno aiutato in questa tesi, in particolare la professoressa M. Lucchin per l'enorme aiuto nella stesura della tesi e la dottoressa M. Salmaso per avermi seguito durante tutta l'attività di tirocinio e nella realizzazione della tesi. Ringrazio in oltre la mia famiglia, per il supporto morale, economico e per avermi sempre sostenuto in tutte le mie scelte. I miei amici Carlo Alberto, Edoardo, Luca e Marco... con cui ho passato molti momenti felici della mia vita. In ultimo, ma non per importanza, ringrazio la mia fidanzata Valentina per gli splendidi anni trascorsi assieme e per quelli che ancora dovremmo trascorrere.





## 6. BIBLIOGRAFIA

**Allegri E., 1941.** La Robinia. Edagricole, Bologna.

**Barcaccia G., Lucchin M., Parrini P., 2000.** Analisi del genoma mediante marcatori molecolari. I. Fondamenti metodologici. Riv. Sementi Elette, 5, 5-15 .

**Barcaccia G. & Lucchin M. & Parrini P., 2000.** Analisi del genoma mediante marcatori molecolari. II: Principali applicazioni. Riv. Sementi Elette, 5, 17-34.

**Bergann F., 1954.** The treatment of 'hard coat' in Robinia seeds. Forst und Jagd 4 (5): 176.

**Brown J.H., 1973.** Height growth prediction for black locus on surface mined areas in West Virginia. West Virginia University, Agricultural Experiment Station, Bulletin no. 620.

**Celesti-Gropow L. & F. Pretto, et alt., 2010.** Flora vascolare alloctona e invasiva delle regioni d'Italia. Roma, Università la Sapienza.

**Chirilei H., 1954.** Heat treatment to accelerate the germination of forest tree seed. Buletin Stiintific Academia Republicii Populare Romania( Sectia de Biologie si Stiinte Agricole) 6 (4): 1037-1045.

**Corenich P., 1981.** Grandi alberi e arbusti europei. Aqarius Ed., Firenze. Pp. 128-129.

**Corsi W., 1963.** Tratamiento de las semillas de Robinia pseudoacacia para un germination rapida. Boletin, Departamento Forestal, Uruguay 5: 7-11.

**Del Favero R., 2004.** I Boschi delle regioni Alpine Italiane: tipologia, funzionamento, selvicoltura. Padova, CLEUP.

**Frolova G.D., 1956.** On the role of cross and self-pollination in black locust seed multiplication. Buletinus Societatii de Stiinte naturale din moscova, seria biologie. 2:99-108.

**Fuisz I., 1957.** Examination of the seed of *Robinia pseudoacacia* and its preparation for sowing. *Erdo* (3) 97-103.

**Gellini R. & Merendi A., 1980.** *Robinia*. *Enciclopedia Agraria Italiana*, vol. X. REDA, Roma. Pp. 757-759.

**Gras M.A., 1990.** Le *Robinia pseudoacacia* en Italie. ECE/FAO, Voyage d'étude. Séminaire sur 'Production et utilisation d'essences croissance à rapide dans le contexte de l'utilisation des sols en Hongrie', Budapest.

**Haragsmin O., 1974.** Nectar production of *Robinia pseudoacacia* in the lower Moldau area. *Vedeckee Prace Vyzkumneho Ustavu Vcelarskeho v Dole u Libcic* 6:25-38.

**Horigome T., Ohkuma T. & Muta M., 1984.** Effect of condensed tannin of false acacia leaves on protein digestibility, as measured with rats. *Japanese Journal of Zootechnical Science* 55(5): 299-306.

**Hutchinson T.C., 1967.** Lime chlorosis is a factor in seedling establishment on calcareous soils. I. A comparative study of species from acidic and calcareous soil in their susceptibility to lime chlorosis. *New Phytologist* 66 (4): 697-707.

**Keresztesi B., 1977.** *Robinia pseudoacacia*: the basis of commercial honey production in Hungary. *Bee World* 58(4):114-50.

**Keresztesi B., 1983.** Breeding and cultivation of black locust, *Robinia pseudoacacia*, in Hungary. *Forest Ecology and management* 6 (3):217-44.

**Keresztesi B., 1988.** *The Black Locust Akadémiai Kiado, Budapest. P. 197.*

**Kim T.W. e Lee K.J. e Lee Y.M., 1986.** Studies on silvicultural properties of *Robinia pseudoacacia*. *Korean Journal of Apicultural* 2 (1):97-108 (in coreano, citato in *Apicultural Abstracts* 38, 1234.

**Kim T.W. e Kim T.J., 1987.** Nectar production and pollination mechanism of *Robinia pseudoacacia*. *Korean Journal of Apiculture* 2 (1):82-92.

**Lazarescu C., 1969.** Biometric studies on the fruit of *Robinia pseudoacacia*. *Revista Padurilor* 84 (12): 615-617.

**Lupe I., 1960.** Scarification of seeds of *Robinia* and other leguminous plants slow to germinate. *Revista Padurilor* 75 (4): 212-215.

**Mondino G.P. & Scotta M., 1987.** *Robinia pseudoacacia* L. nell'ambiente forestale piemontese. Firenze.

**Olson D.F. Jr., 1974.** *Robinia* L.-Locust. In: Seeds of woody plants in the United states. USDA, Forest Service, Agriculture Handbook 450: 728-731.

**Ozawa J. & Matsuura T., 1954.** Studies on the hard seeds of leguminous trees. Comparison of species and provenances as regards hard seeds, resulting from difference of treatment. Special Report, Forest Experiment Station, Hokkaido 2: 50-58.

**Peter J., 1972.** Investigations on floral nectar secretion in non-fruiting trees and shrubs. *Mosonmagyarovari Mezogazdasagtudományi Kar Kozlumenyei* 15 (18):3-46.

**Radu G. e Bakos V., 1973.** The MSS-1 scarification machine for seeds of *Robinia pseudoacacia*. *Revista padurilor* 88(11):616-619.

**Reali A., 1871.** Gli alberi e gli arbusti del Circondario e dell'Appennino Camense. Camerino. Tipografia Borgarelli. Pp. 285-300.

**Roberts D.R. & Carpenter S.B., 1983.** The influence of seed scarification and site preparation on establishment of black locust on surface mined sites. *Tree Planters' Notes* 34(3): 28-30.

**Sas B., 1963.** Scarification Trials with *Robinia* seeds. *Erdo* 12 (5).

**Swingle C.F., 1937.** Experiments in propagating shipmast locust. *Journal of Forestry* 35:713-720.

**Tarnapolsky C.E., 1971.** Desarrollo cronologico de germinaciones en *Robinia pseudoacacia*. *Revista Forestal Argentina* 15(3): 76-79.

**Toda R. e Ishikawa H., 1951.** Hastening the germination of Robinia seeds by use boiling water. Journal of the Japanese Forestry Society 33(9):312.

**Tompa K., 1958.** Notes on the treatment of Robinia pseudoacacia seeds before sowing. Erdo 7 (3):81-87.

**Tocci A.V., 1986.** I Prodotti secondari del bosco in cucina. Mistero dell'agricoltura e foreste, Collana verde N° 23. Pp. 24-50.

**Vaulot G.,1914.** Le Robinier faux acacia. Ed, Bailere, Paris.

**Velkov D. 1970.** The effect of heat on the moisture regime viability of Robinia pseudocacia seeds. Gorkostopanska Nauka 7 (6): 25-38.

**Vidano C., 1986.** La Robinia per l'apicoltura. Apicoltore moderno 77(3): 99-109.

**Yacubson D., 1978.** Germinacion y letargo ed semillas forestales de species cultivadas en la Argentina. Folleto Tecnico Forestal, Istituto Forestal National n° 46.