



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOSISTEMATICA ED ECOLOGIA VEGETALE
SCUOLA DI DOTTORATO "U. MONTELATICI"
XXV CICLO

Coordinatore del dottorato: Prof. Paolo Grossoni

**Analisi morfologica e
molecolare
della popolazione toscana di
Cistus laurifolius L.**

BIO-03

Dottorando

Barbara Barlozzini

Tutor

Prof. Paolo Grossoni

Co-tutor

Dott. Piero Bruschi
Dott. Federico Sebastiani

Anni 2009/2012

*A te che, cresciuto nel mio grembo,
mi hai accompagnato negli ultimi nove mesi
di questo percorso.*

INDICE

1. PREFERENZA	6
2. INTRODUZIONE	7
2.1 Biodiversità	8
2.2 Valutazione della diversità genetica	11
2.3 Migrazione o flusso genico	12
2.4 Mutazione	12
2.5 Deriva genetica	13
2.6 Selezione naturale	14
2.7 Incrocio assortativo	14
2.8 Inbreeding	14
2.9 La classificazione scientifica e sistematica molecolare	15
2.10 I genomi vegetali	16
2.11 Marcatori molecolari: microsatelliti nucleari e plastidiali	17
3. INTRODUZIONE AL GENERE <i>CISTUS</i>	24
3.1 Fitognosia delle Cistaceae	25
3.1.1 Cariologia	27
3.1.2 Riproduzione	27
3.1.3 Fitochimica	27
3.2 Fitognosia del genere <i>Cistus</i>	28
4. <i>CISTUS LAURIFOLIUS</i> L.	31
4.1 Morfologia	32
4.2 Areale di distribuzione	33
4.3 Storia	36
4.4 Ecologia	36
5. SCOPO DEL LAVORO	37
5.1 Caratterizzazione morfologica	38
5.2 Sviluppo e analisi dei marcatori molecolari nucleari	39
5.3 Analisi dei marcatori plastidiali	40
5.4 Caratterizzazione fitochimica	40
5.5 Test <i>in vitro</i>	43
6. MATERIALI E METODI	44
6.1 Campionamento	45
6.2 Caratterizzazione morfologica	51
6.3 Sviluppo e analisi dei marcatori molecolari nucleari	53
6.4 Analisi dei marcatori plastidiali	58
6.5 Analisi fitochimica	60
6.6 Test <i>in vitro</i>	68
7. RISULTATI	74
7.1 Caratterizzazione morfologica	75
7.2 Progettazione e analisi dei marcatori molecolari nucleari	80
7.3 Analisi marcatori plastidiali	85
7.4 Caratterizzazione fitochimica	87
7.5 Test <i>in vitro</i>	96
8. CONCLUSIONI	99
9. BIBLIOGRAFIA	104

INDICE TABELLE

Tabella 1. Coordinate, numero di esemplari e sottopopolazioni campionate a Santa Brigida.	50
Tabella 2. Coordinate e numero di esemplari delle tre differenti popolazioni spagnole.	51
Tabella 3. Mix per la reazione di amplificazione.	55
Tabella 4. Mix per la reazione di marcatura.	56
Tabella 5. Mix per la reazione di amplificazione dei microsatelliti plastidiali.	59
Tabella 6. Marcatori microsatelliti plastidiali ccmp1-10 (Weising e Gardner, 1999) saggiati sul cisto.	59
Tabella 7. Marcatori microsatellite plastidiali delle Fagaceae cmcs 1-14 (Sebastiani <i>et al.</i> , 2004) saggiati sul cisto.	60
Tabella 8. Coefficienti di variazione per le quattro popolazioni campionate.	75
Tabella 9. Analisi statistica descrittiva: media, deviazione standard e coefficiente di variazione (CV) suddivisi per le quattro popolazioni (Santa Brigida, Spagna 1,2 e 3).	76
Tabella 10. Analisi delle componenti principali.	77
Tabella 11. Risultati dell'ANOVA a due vie (Modello Lineare Generale) condotta sui tre fattori estratti. *** P<0,001; n.s.: non significativo.	78
Tabella 12. Analisi post-hoc HSD di Tuckey condotta sui tre fattori che spiegano la totalità della variabilità. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti ad una P<0,05.	78
Tabella 13. Funzioni discriminanti estratte mediante approccio stepwise.	78
Tabella 14. Coefficienti standardizzati.	79
Tabella 15. Marcatori microsatelliti nucleari candidati.	80
Tabella 16. Marcatori molecolari nucleari selezionati per le analisi del polimorfismo all'interno e tra le popolazioni saggiate.	81
Tabella 17. Indici di diversità genetica suddivisi per popolazione e per locus all'interno di ogni popolazione.	82
Tabella 18. Valori medi degli indici calcolati, suddivisi per popolazione.	83
Tabella 19. Risultati test Amova.	84
Tabella 20. Trasferibilità dei sei loci microsatellite testati su cinque diverse specie presenti in Toscana.	85
Tabella 21. Aplotipi originati dal ccmp3 e cs3.	85
Tabella 22. Media degli indici valutati per i marcatori plastidiali ccmp3 e cs3, suddivisi per popolazione.	87
Tabella 23. Risultati screening fitochimico.	88
Tabella 24. Analisi quantitativa della componente polifenolica degli estratti da droga fresca e secca ottenuti per macerazione tradizionale.	88
Tabella 25. Analisi quantitativa della componente polifenolica dell'estratto ottenuto tramite Naviglio Estrattore.	89
Tabella 26. Media e errore standard dei principali picchi identificati nelle due differenti specie.	94
Tabella 27. IC ₅₀ dell'estratto ENES nel test DPPH dell'attività antiradicalica.	96
Tabella 28. Vitalità cellulare percentuale con il test della colorazione con Trypan Blue dei linfomonociti trattati con estratto ENES e EMTF.	96
Tabella 29. Attività citoprotettiva di cisto su cellule tubulari renali stimulate con perossido di idrogeno, valutata nelle 24 ore.	97

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Deriva genetica per effetto del fondatore.....	13
Figura 2. Deriva genetica per effetto collo di bottiglia.....	14
Figura 3. Fasi della PCR.....	19
Figura 4. Schema delle principali classi di marcatori molecolari suddivisi in base alla tecnica utilizzata e ai loci saggiati.....	20
Figura 5. Tipologie differenti di microsatelliti.....	21
Figura 6. Esempio di sequenze microsatellite differenti su due diversi individui della stessa specie.....	22
Figura 7. Distribuzione del genere <i>Cistus</i> . In grigio è stata evidenziata la regione mediterranea. I diagrammi a torta mostrano la distinzioni tra specie con fiori bianchi (porzione bianca) e con fiori viola (porzione grigia).	29
Figura 8. Immagini rappresentanti le diverse parti anatomiche di <i>Cistus laurifolius</i>	33
Figura 9. Rapporto fra ANPIL e SIC IT5140009 – SIR 43 “Poggio Ripaghera – Santa Brigida	45
Figura 10. Tipologie vegetazionali caratterizzanti l'ANPIL.	46
Figura 11. Profilo della vegetazione con bosco pineta rada di pino marittimo nei pressi del cimitero di S. Brigida.....	47
Figura 12. Profilo della vegetazione con bosco misto di querce caducifoglie e arbusteto ad eriche e ginestra (transetto eseguito nella zona fra Fornellaccio e Fontassenzio).....	48
Figura 13. Protocollo di estrazione del DNA con il kit DNeasy Plant Mini kit (Quiagen)..	53
Figura 14. Nebulizer Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).....	54
Figura 15. Ligazione dei frammenti di DNA ad un vettore plasmidico pZero-2 (Zero Background Cloning Kit, Invitrogen) e trasformazione in cellule competenti di <i>E. coli</i>	54
Figura 16. Elettroferogramma dal software GENMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).....	56
Figura 17. Naviglio Estrattore	61
Figura 18. Reazione del DPPH con un composto antiossidante	67
Figura 19. Separazione, tramite centrifugazioni, dei vari componenti del sangue.	69
Figura 20. Ceppi batterici e funghi utilizzati per la valutazione preliminare dell'attività antibatterica.	72
Figura 21. Metodo dell'agar solido: il campione è disciolto in agar e posto nel solco centrale dove è attraversato dalla semina dei ceppi. A destra e a sinistra si leggono i controlli di crescita in assenza di campione.	72
Figura 22. Analisi discriminante: grafico di dispersione dei singoli casi.	79
Figura 23. Pattern allelici delle quattro popolazioni analizzate.	83
Figura 24. Percentuale di varianza molecolare calcolata secondo il test AMOVA.....	84
Figura 25. Aplotipi con relativa frequenza.....	86
Figura 26. Pattern allelici delle due popolazioni analizzate.....	86
Figura 27. Spettro di massa dell'acido p-cumarico	90
Figura 28. Spettri di massa dei costituenti di <i>Cistus laurifolius</i>	93
Figura 29. Confronto tra il cromatogramma di <i>Cistus laurifolius</i> (rosso) e <i>Cistus salviifolius</i> (blu).....	94
Figura 30. Percentuale dei vari composti organici volatili presenti nelle due specie di cisto analizzate.....	95

1. PREFAZIONE

Alcune specie del genere *Cistus* non sono state ancora ben caratterizzate dal punto di vista tassonomico. Fenomeni come la speciazione simpatica, l'ibridazione o l'introggressione che si verificano con frequenza tra le specie di questo genere, talvolta rendono difficoltosa la classificazione basata solo su criteri morfologici e anatomici.

Le biotecnologie molecolari in anni recenti sono diventate uno strumento indispensabile per l'identificazione e la distinzione delle specie animali e vegetali, ma esiste solo un numero esiguo di lavori nazionali e internazionali che utilizzano le tecnologie del DNA e dei marcatori molecolari sul genere *Cistus*. In particolare fino ad ora non erano stati sviluppati marcatori molecolari per la specie *Cistus laurifolius* L., endemica per il nostro territorio poiché presente a livello nazionale solo in Toscana, nel Comune di Pontassieve (Santa Brigida).

Lo sviluppo di marcatori molecolari, nella fattispecie microsatelliti, nucleari, è servito per stimare la distanza genetica che esiste tra questa popolazione e la popolazione spagnola, e quindi per ipotizzare una possibile origine.

Lo studio della specie nel suo complesso è stato anche supportato dall'analisi della variabilità morfologica fogliare tra i vari individui e dall'analisi dei metaboliti secondari prodotti dalla specie, componente volatile (oli essenziali) e non (polifenoli).

La conoscenza molecolare, unita a un'approfondita analisi morfologica, è stata il punto di partenza per l'analisi d'ipotesi e messa a punto di piani per la protezione e salvaguardia e utilizzo sostenibile della popolazione italiana di *Cistus laurifolius*.

La ricerca è stata finanziata dal Comune di Pontassieve tramite due finanziamenti al Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli studi di Firenze.

2. INTRODUZIONE



Sempre di più negli ultimi anni è divenuto necessario approfondire la conoscenza delle specie attraverso la loro caratterizzazione genetica. Descrivere le peculiarità di una specie mediante l'analisi molecolare permette, in sinergia con l'analisi morfologica e fitosociologica, di costruire un quadro completo per l'identificazione e il monitoraggio del nostro oggetto di studio. Attraverso l'indagine genetica si riesce ad avere un quadro dettagliato della variabilità delle risorse genetiche, sia animali che vegetali come nel nostro caso, facilitando tutti quegli interventi finalizzati a diminuire o arrestare l'erosione della biodiversità.

Al fine di introdurre l'argomento della ricerca, analisi morfologica e molecolare di una specie critica della flora italiana, risulta utile soffermarsi su alcuni dei temi di riferimento e dei processi che concorrono nel determinare la variabilità del patrimonio genetico di una specie.

2.1 Biodiversità

Il termine biodiversità iniziò a essere utilizzato negli anni '80 quando venne definito come "diversità in tutti i livelli di organizzazione biologica" (Rosen, 1985). Infatti, quando si parla di biodiversità, si esplica un concetto che può essere considerato a vari livelli di diversità, da quello ecosistemico, più ampio, a quello genetico, più ristretto.

Possiamo distinguere:

- diversità genetica: stimata con metodi molecolari attraverso lo studio del DNA e degli enzimi, indice della plasticità e dell'adattabilità delle specie e delle popolazioni alle varie condizioni ambientali;

- diversità tassonomica: valutata come numero di specie differenti presenti in un dato territorio;

- diversità ecosistemica: espressa come complessità delle comunità, intesa come numero di specie, abbondanza e interazioni fra esse.

La ricerca indirizzata all'analisi morfologica e molecolare di una specie, al fine di comprenderne le dinamiche di distribuzione, si inserisce nel complesso più ampio di conoscenza della biodiversità. Conoscere la variabilità vegetale, a diversi livelli, da quello ecosistemico a quello genetico, risulta essere il primo passo necessario per valutare la necessità di tutela e progettare la messa in campo di politiche di monitoraggio e gestione della biodiversità.

A partire dagli anni '70 i Capi di Stato e di Governo dell'Unione Europea hanno assunto la consapevolezza e hanno intrapreso politiche ambientali andando a creare un sistema di leggi per la salvaguardia ambientale. L'Unione Europea ha sottoscritto e ratificato una serie di accordi internazionali:

- CITES per commercio di specie minacciate;
- Convenzione di Bonn per la fauna migratrice;
- Convenzione di Barcellona per la conservazione del Mediterraneo;
- Convenzione per la lotta al fenomeno della desertificazione (UNCCD).

La svolta più importante si ebbe nel 1992 con il Summit di Rio de Janeiro a cui parteciparono 172 paesi, organizzazioni governative e 2400 membri di organizzazione non-governative. In quest'occasione si volevano definire le problematiche ambientali in atto, stabilire interventi a breve, medio e lungo termine e progettare politiche per uno sviluppo sostenibile. Fu importante riconoscere il fatto che l'ambiente deve essere considerato a livello globale e che quindi necessita l'azione coordinata di tutti gli stati. Nel corso della Conferenza furono siglati cinque accordi internazionali: la Dichiarazione di Rio su ambiente e sviluppo (Carta della Terra), l'Agenda 21, la Dichiarazione dei principi sulla gestione delle foreste, la Convenzione sulla diversità biologica e la Convenzione quadro sui cambiamenti climatici.

L'Italia ha ratificato la Convenzione di Rio con Legge n. 124 del 14 febbraio 1994 con l'obiettivo di conservare la diversità biologica a tutti i livelli, utilizzare in maniera durevole e sostenibile i suoi elementi, ripartire in maniera giusta ed equa i vantaggi che derivano dallo sfruttamento delle risorse genetiche e dal trasferimento delle tecnologie ad esse collegate. Questa ratifica si aggiunge alla legislazione emanata per la creazione di aree protette terrestri e marine: la Legge Quadro sulle aree protette (L. 394/91) e la Legge per la difesa del mare (L. 979/82) con successive modifiche ed integrazioni. Alla data del 2010 in Italia erano state istituite 871 aree protette per 3.163.591 ettari a terra e 2.853.034 ettari a mare, a queste vanno aggiunte le 400 Aree (430.000 ettari) sottoposte ad un particolare regime di tutela.

Al fine di poter creare una rete di gestione delle aree protette è stato creato Natura2000, istituita ai sensi della Direttiva 92/43/CEE "Habitat",

strumento della Comunità Europea per la conservazione della biodiversità. Natura2000 comprende Siti di Importanza Comunitaria (SIC) e Zone di Protezione Speciale (ZPS) istituite con Direttiva 79/409/CEE "Uccelli". Per quanto riguarda il nostro Paese la rete Natura2000 copre il 21% del territorio nazionale con 2287 SIC e 601 ZPS (Ministero dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare, ottobre 2011). All'interno di quest'aree viene monitorata, gestita e conservata la biodiversità.

Nel 2001 il Consiglio d'Europa ha espresso la necessità di avviare azioni volte ad arrestare la perdita di biodiversità entro il 2010, opinione poi ribadita durante il Summit Mondiale per lo Sviluppo Sostenibile (Johannesburg, 2002). Durante quest'ultimo Summit è stato varato un piano d'azione con l'obiettivo di ridurre drasticamente la perdita di biodiversità entro il 2010, modificando, necessariamente, quell'iniziale volontà di "arresto della perdita di biodiversità entro il 2010".

Ai vari Stati membri dell'Unione è spettato il compito di progettare e mettere in campo politiche volte a salvaguardare habitat e specie, conservare e ripristinare la biodiversità nei differenti ecosistemi, monitorare la compatibilità tra politiche di sviluppo territoriale e la conservazione, ridurre l'impatto di specie e genotipi esotici invasivi.

Nel 2004 con il Messaggio di Malahide, è stata avviata l'iniziativa "Countdown 2010" al fine di sensibilizzare le amministrazioni pubbliche e la società sull'obiettivo fissato per il 2010.

In questa sede è stato sottolineato il fatto che le politiche di conservazione debbano avere come base una salda conoscenza delle specie, solo da quest'ultima e dal monitoraggio della sua distribuzione emergono le varie necessità di conservazione e gestione. Al fine di perseguire quest'obiettivo è stata portata avanti una politica di sorveglianza degli habitat che ha prodotto una serie di Rapporti Nazionali per presentare il prodotto dell'analisi della conservazione degli habitat e delle specie. Il prossimo Rapporto dovrà essere riferito al periodo 2007-2012.

2.2 Valutazione della diversità genetica

La valutazione della diversità genetica ha lo scopo di indagare le dinamiche evolutive in termini quantitativi e la variabilità a livello di frequenze alleliche e genotipiche all'interno della stessa e tra differenti popolazioni.

La popolazione, definita come insieme di individui della stessa specie che occupano la stessa regione geografica, è la più piccola unità nella quale può operare l'evoluzione, risultato dell'origine di nuovi alleli o del cambiamento della loro frequenza. La valutazione della diversità genetica consiste nello studio della trasmissione alla progenie delle caratteristiche genetiche (evoluzione temporale) e della loro distribuzione spaziale, attraverso l'indagine sulle forze che sono intervenute nel processo.

La conoscenza della struttura genetica delle popolazioni è un passaggio necessario nel processo di formulazione di ipotesi per il mantenimento e la salvaguardia della biodiversità delle popolazioni stesse. La variazione genetica ha tre componenti: la diversità genetica intesa come tasso di variazione genetica, la differenziazione genetica ossia la distribuzione della variazione genetica nella popolazione e la distanza genetica, il tasso di variazione genetica tra popolazioni.

Quando il regime di incrocio è casuale e un certo altro numero di presupposti sono rispettati, grazie alla legge di Hardy-Weinberg è possibile calcolare le frequenze genotipiche di una progenie, dopo una sola generazione di incroci casuali, direttamente dalle frequenze alleliche degli individui parentali.

Le assunzioni del modello di Hardy-Weinberg sono che la popolazione sia grande, gli incroci avvengano a caso, gli individui non differiscano per tasso di riproduzione e capacità riproduttiva, gli alleli siano stabili e quindi ci sia assenza di mutazione e non sussistano fenomeni di migrazione. Queste condizioni teoriche non si verificano nelle popolazioni naturali ma il modello regge bene a molte violazioni e permette di analizzare come le violazioni stesse, sistemi d'incrocio, mutazione, migrazione, deriva e selezione naturale influenzino la genetica e l'evoluzione delle popolazioni. Lo studio della variabilità delle popolazioni naturali viene condotto andando a valutare la frequenza dei polimorfismi e del grado di eterozigotità. Le statistiche F , sviluppate da Sewall Wright, permettono di avere una visione integrata della variazione genetica e della struttura delle popolazioni a tre livelli gerarchici: la

variazione all'interno delle sottopopolazioni, quella tra le sottopopolazioni e la variazione totale nella metapopolazione. Tutti e tre questi indici misurano la perdita di eterozigosità rispetto all'equilibrio di Hardy-Weinberg usando tre misure di H , l'eterozigosità totale della metapopolazione (H_T), l'eterozigosità osservata entro le sottopopolazioni (H_O) e l'eterozigosità attesa all'interno delle sottopopolazioni (H_E). Le statistiche F sono così definite:

- F_{IS} : misura la frazione di riduzione di eterozigoti all'interno delle sottopopolazioni: $F_{IS} = (H_E - H_O) / H_E$

- F_{IT} : misura la riduzione di eterozigosità in un individuo (I) rispetto alla metapopolazione totale (T): $F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T$

Valori positivi di questi due indici stanno ad indicare un difetto di eterozigoti, valori negativi un eccesso.

- F_{ST} : misura la riduzione relativa dell'eterozigosità della metapopolazione dovuta alle differenziazioni delle sottopopolazioni. Ha valori sempre positivi, almeno dal punto di vista teorico e indica l'esistenza di un deficit di eterozigoti nella meta-popolazione dovuto a una differenziazione tra le sottopopolazioni.

$$F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS}) = H_T - H_O / H_T$$

2.3 Migrazione o flusso genico

La migrazione è definita come lo spostamento degli individui da una popolazione all'altra, mentre il flusso genico è lo spostamento dei geni. In genetica di popolazione sono utilizzati spesso come sinonimi perché la prima implica anche il secondo.

Poiché esiste una stretta correlazione tra diversità genetica e fitness delle popolazioni (Reed e Frankham, 2003), analizzare la migrazione e il flusso genico è necessario per la conservazione delle specie che si trovano a vivere in habitat isolati e frammentati.

2.4 Mutazione

La mutazione è importante perché determina l'insorgenza iniziale della variazione genetica. La mutazione fornisce il materiale genetico grezzo su cui agisce poi l'evoluzione. Generalmente il tasso di mutazione è estremamente

basso: per una mutazione nucleare per gene per generazione dell'ordine di $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ mutazioni (Skelton, 1993).

2.5 Deriva genetica

La deriva genetica si riferisce alle fluttuazioni delle frequenze alleliche che avvengono per puro effetto del caso, in particolare nelle piccole sottopopolazioni, come risultato dell'errore dovuto al campionamento. Ha come principale effetto la riduzione della variabilità genetica. La perdita di variabilità avviene in maniera del tutto casuale e produce un maggiore effetto in popolazioni di piccole dimensione e quindi può avere conseguenze per la conservazione di specie rare o minacciate.

La deriva può essere dovuta a vari fenomeni:

-effetto del fondatore: un numero limitato di individui si distacca dalla popolazione di appartenenza per poi fondarne una nuova che conseguentemente potrà essere caratterizzata da frequenze alleliche diverse, con una riduzione della variazione genetica fino alla fissazione casuale degli alleli;

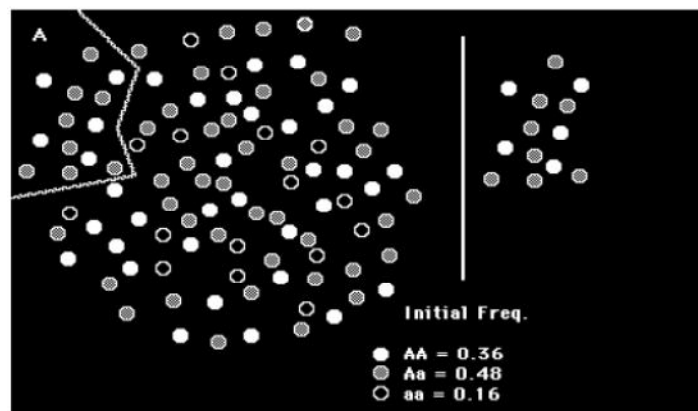


Figura 1. Deriva genetica per effetto del fondatore.

-effetto collo di bottiglia: una popolazione si ritrova in condizioni ambientali sfavorevoli che portano ad una riduzione del numero di individui con successiva variazione casuale delle frequenze alleliche.



Figura 2. Deriva genetica per effetto collo di bottiglia.

2.6 Selezione naturale

La selezione naturale può essere definita come la riproduzione differenziale dei genotipi e questo implica che gli individui che posseggono certi geni vantaggiosi producano una progenie più numerosa di altri alterando quindi la frequenza di quei geni.

La selezione può portare ad un aumento della variabilità genetica o ad un mantenimento, la prevalenza dell'uno su l'altro dipende essenzialmente dalle fitness relative dei genotipi e dalle frequenze alleliche della popolazione.

2.7 Incrocio assortativo

La legge di Hardy-Weinberg considera che i membri della popolazione si incrocino in maniera casuale, ma non sempre questo avviene.

L'incrocio non casuale si può avere per accoppiamento preferenziale di individui dal fenotipo simile (incrocio assortativo positivo) o dal fenotipo del tutto differente (incrocio per assortativo negativo). Gli effetti genetici dell'incrocio assortativo agiscono solo su quei loci che influenzano il carattere fenotipico per il quale l'organismo si sta incrociando assortativamente.

2.8 Inbreeding

Lo scostamento dall'incrocio del tutto casuale si può avere anche con un incrocio che si verifica allorquando si ha unione preferenziale tra individui imparentati geneticamente molto simili, tra "parenti stretti". Popolazioni molto piccole o isolate sono facilmente caratterizzate da inbreeding con l'effetto di aumentare l'omozigosità per tutti i loci. L'inbreeding viene misurato attraverso

il coefficiente di inbreeding F , maggiore sarà F e maggiore sarà la riduzione di eterozigosità rispetto a quanto atteso secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

$$F = (H_E - H_O) / H_E$$

Nel caso di incrocio completamente casuale $F=0$ poiché l'eterozigosità attesa e osservata sono uguali.

Risulta quindi estremamente importante, ai fini conservazionistici, comprendere le forze che agiscono su una popolazione e in che maniera e direzione. Solo comprendendo quale di queste è predominante si può intervenire programmando interventi mirati di monitoraggio, gestione e conservazione della specie.

2.9 La classificazione scientifica e sistematica molecolare

In biologia classificare significa raggruppare gli organismi in categorie tassonomiche, ordinate in maniera gerarchica, in base soprattutto a caratteri morfologici e sessuali.

I tassonomi si occupano di classificare i vegetali in base alle loro somiglianze, emergenti dalla loro osservazione, già come fecero John Ray prima (1627-1705) e Carolus Linnaeus in maniera più sviluppata poi. Linneo cercò di riunire le specie in base alle loro caratteristiche morfologiche non considerando, necessariamente, il concetto della non immutabilità delle specie. Solo dopo la divulgazione delle teorie evolutive di Charles Darwin le specie vennero riesaminate alla luce dell'evoluzione e della discendenza filogenetica.

In questa fase inizia a nascere una sistematica non più basata su una classificazione derivante dalla sola analisi morfologica, ma su un approccio filogenetico che si avvale di differenze anche a livello biochimico, citologico e soprattutto genetico volto a ricostruire il percorso evolutivo delle specie.

Gli studi basati sull'analisi dei marcatori morfologici e fisiologici, benché ritenuto necessario in una prima fase dell'indagine, risulta essere comunque riduttivo poiché mette in luce solo quei caratteri espressi e fortemente influenzati dalle condizioni ambientali. I caratteri morfologici facilmente osservabili sono limitati e scarsamente polimorfici in quanto spesso vengono mascherati per eterozigosi, ma dalla loro parte hanno la semplicità e il basso costo per il rilevamento.

L'avvento dei marcatori molecolari ha aperto la strada alla sistematica molecolare ossia una sistematica fatta su basi macromolecolari, sull'analisi di proteine e di acidi nucleici (DNA e RNA) per la ricostruzione delle relazioni tra gli organismi. I dati molecolari ci permettono di formulare e verificare ipotesi filogenetiche basandosi su dati inconfutabili, ottenendo informazioni riguardo il grado di similarità o diversità tra le specie al fine di assegnargli la giusta collocazione tassonomica.

2.10 I genomi vegetali

La cellula vegetale contiene tre genomi diversi: quello contenuto nel cloroplasto, quello del mitocondrio e del nucleo. I sistematici hanno utilizzato dati derivanti da tutti e tre i genomi per poter evidenziare le differenze tra individui. I primi due sono in genere di origine uniparentale (soprattutto materna nelle angiosperme) mentre il genoma nucleare è di derivazione biparentale (Harris e Ingram, 1991; Reboud e Zeyl, 1994; Mogensen, 1996; Röhr *et al.*, 1998).

Il genoma del mitocondrio, costituito da alcune centinaia di migliaia di coppie di basi di DNA (200-2500 kbp), circolare e codifica per vari tRNA e rRNA oltre che per vari polipeptidi coinvolti nel metabolismo energetico. Questo genoma si riordina frequentemente così che la stessa cellula può presentarne molte forme riarrangiate. Ciò significa che i riarrangiamenti del genoma avvengono così spesso all'interno degli individui vegetali che esso non può discriminare specie o gruppi di specie e non risulta pertanto utile a dedurre relazioni di parentela fra gli individui.

Il genoma plastidiale è una doppia elica organizzata in forma circolare delle dimensioni di 120-180 kb. Il genoma è suddiviso in una regione più grande a singola copia e in una piccola parte con sequenze ripetute invertite. Questo genoma risulta stabile sia nelle cellule che nelle specie manifestando riarrangiamenti piuttosto rari nell'evoluzione (Wolfe *et al.*, 1987; Clegg *et al.*, 1994); pertanto è un utile strumento per studi filogenetici (King e Ferris, 1998; Palme e Vendramin, 2002; Petit *et al.*, 2002a, b).

2.11 Marcatori molecolari: microsatelliti nucleari e plastidiali

I primi marcatori molecolari utilizzati in genetica di popolazioni furono le proteine, in particolare con l'analisi di proteine solubili, gli isoenzimi. Gli isoenzimi sono forme diverse di uno stesso enzima con stessa specificità per il substrato, ciascuna forma può essere collegata ad un particolare allele. I primi studi vennero intrapresi su *Drosophila pseudoobscura* (Lewontin e Hubby, 1966) per poi essere trasferiti anche in ambito vegetale per studi di genetica di popolazione (Brown, 1979). Rispetto ai vecchi metodi di analisi morfologica questi marcatori presentano il vantaggio di essere co-dominanti, di non presentare effetti epistatici o pleiotropici, di essere utilizzabili facilmente e a basso costo fornendo risultati riproducibili. D'altra parte però il numero di loci polimorfici facilmente analizzabili è piuttosto limitato e inoltre la variabilità osservata potrebbe non essere rappresentativa dell'intero genoma in quanto i loci enzimatici rappresentano solo la parte espressa del genoma.

I marcatori genetici più recenti sono basati sull'analisi delle sequenze di DNA. L'analisi del DNA risulta essere uno strumento indispensabile per la sistematica vegetale poiché robusto, affidabile e ripetibile per l'analisi delle variazioni del patrimonio genetico al fine di mettere in luce le relazioni tra gli individui e le specie.

L'incontro tra la tassonomia tradizionale e la nuova sistematica molecolare permette di fornire un quadro più ampio e dettagliato della variazione genetica intra- e interspecifica.

I polimorfismi nella sequenza del DNA possono essere evidenziati attraverso i marcatori molecolari che mettono in luce la presenza di alleli diversi per uno stesso locus in cromosomi omologhi. Possono essere rilevati attraverso sonde (probe) o inneschi (primer) specifici che amplificano via PCR un tratto cromosomico (Barcaccia *et al.*, 2000), un frammento di DNA, di dimensioni variabili, da 50 a 3000 bp, (Gupta *et al.*, 1996; Vendramin e Ziegenhagen, 1997; Barcaccia *et al.*, 2000).

Analizzare il genoma attraverso i marcatori significa rilevare le diversità, espresse come mutazioni, di regioni di DNA omologhe in individui della stessa specie.

I marcatori molecolari si sono rivelati strumenti vantaggiosi poiché:

-non vengono influenzati dall'ambiente in cui si trova l'individuo analizzando le differenze a livello del DNA;

-mettono in luce le differenze dell'intero genoma, parti trascritte e non, quindi anche introni e regioni di regolazione;

-non presentano effetti epistatici e pleiotropici e spesso sono co-dominanti, danno quindi la possibilità di distinguere l'omozigote dall'eterozigote;

-spesso sono polimorfismi neutri, una variazione allelica nel locus marcatore non ha effetto a livello fenotipico e quindi selettivo.

I vari marcatori molecolari possono essere distinti in base alle tecniche utilizzate per le analisi o in base ai loci saggiati.

Nel primo caso si possono distinguere i marcatori che richiedono:

-tecniche basate sulla restrizione e ibridazione di acidi nucleici: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e VNTR (Variable Number of Tandem Repeat);

-tecniche basate sulla PCR (Polymerase Chain Reaction): SSR (Simple Sequence Repeat), I-SSR (Inter-Simple sequence Repeat), SNP (Single Sequence Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

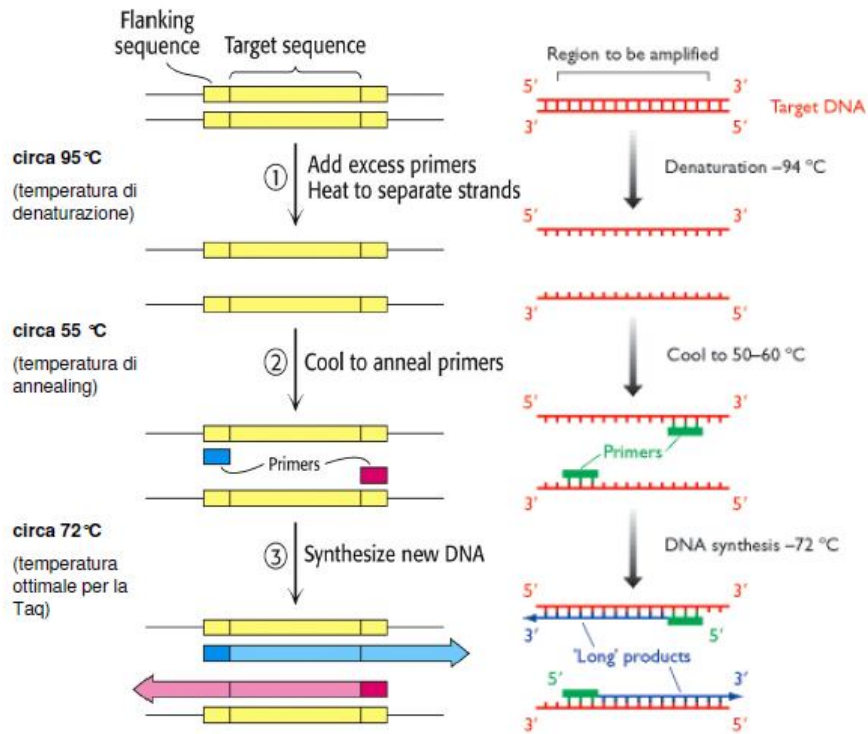


Figura 3. Fasi della PCR.

Nel secondo caso possiamo distinguere:

- Marcatori "multi-locus": vengono analizzati simultaneamente molti loci genomici dopo aver amplificato tratti casuali del genoma tramite primers oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (AFLP, I-SSR, RAPD). Sono marcatori dominanti poiché per ogni locus si evidenzia la presenza o l'assenza della banda, ma non si può distinguere l'omozigote dall'eterozigote;

- Marcatori "single locus": si basano sull'utilizzo di sonde o primers specifici per determinati loci genomici per ibridare o amplificare tratti cromosomici a sequenza nota. Sono marcatori co-dominanti poiché possono essere distinti i loci omozigoti da quelli eterozigoti.

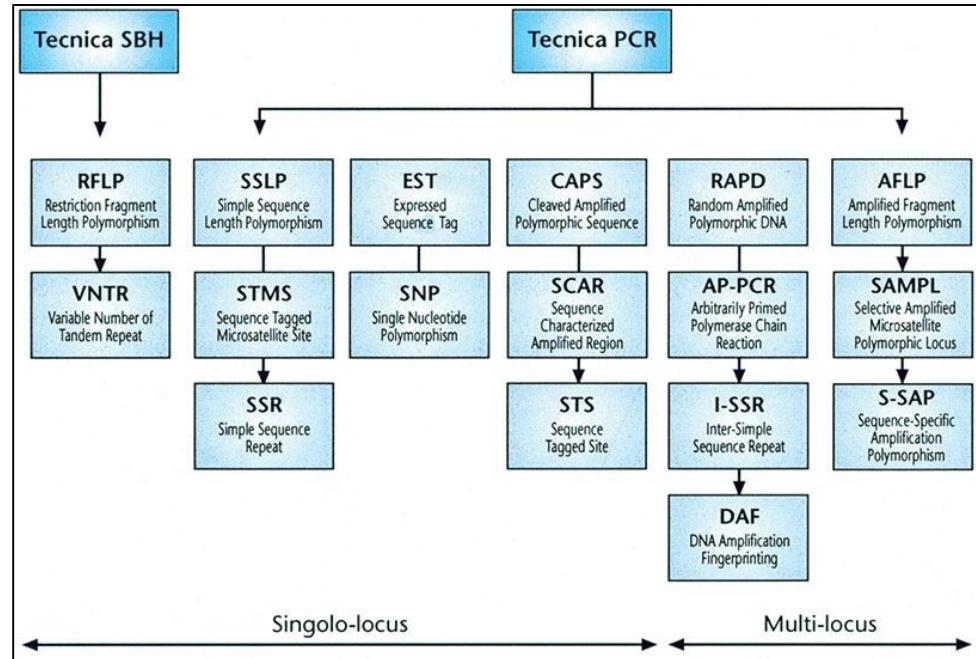


Figura 4. Schema delle principali classi di marcatori molecolari suddivisi in base alla tecnica utilizzata e ai loci saggiati.

I marcatori che si basano sulle tecniche di ibridazione e di restrizione sono stati i primi ad essere messi a punto grazie alle endonucleasi di restrizione, enzimi di origine batterica capaci di tagliare i legami fosfodiesterici del DNA andando a riconoscere particolari sequenze di basi, i siti di taglio, e producendo quindi frammenti polinucleotidici di dimensioni variabili, oltre che alle tecnica di ibridazione messa a punto da Southern (1975):

- ❖ **RFLP**: il polimorfismo della lunghezze dei frammenti di restrizione (Restriction Fragment Length Polymorphism) è un marcatore co-dominante che mette in evidenza le differenze di peso tra frammenti di DNA che si ottengono dopo aver digerito il DNA genomico con enzimi di restrizione.
- ❖ **VNTR**: questo polimorfismo deriva dalla variazione di sequenze ripetute in tandem (Variable Number of Tandem Repeats) comprese tra due siti di restrizione. Sequenze altamente ripetute, al di fuori delle regioni codificanti, si ritrovano nei genomi di tutti gli organismi e mostrano elevato polimorfismo.

La vera rivoluzione in questo campo però si ebbe con la messa a punto della Polimerase Chain Reaction (PCR) da parte di Mullis et al. (1987) che permise di analizzare un elevato numero di campioni, anche con basse quantità di DNA, con tempi e costi ridotti. La PCR amplifica *in vitro* o per via enzimatica uno o più specifici segmenti di DNA, situati tra due sequenze note, producendone un numero elevato di copie operando attraverso denaturazione, ibridazione dei primers e sintesi dei nuovi frammenti (Vendramin e Ziegenhagen, 1997; Barcaccia *et al.*, 2000).

- ❖ **RAPD:** la tecnica implica un'amplificazione del DNA con primers casuali (Random Amplified Polymorphic DNA) la permette di mettere in luce polimorfismi dovuti a delezioni o sostituzioni in uno o entrambi i siti di appaiamento dei primers evidenziati sul gel come variazione della lunghezza del prodotto di amplificazione o come scomparsa del prodotto.
- ❖ **SSR:** questi marcatori sono noti come microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeat) e mettono in evidenza polimorfismi a livello di sequenze, di poche basi, ripetute di DNA (le differenze riguardano le volte che il motivo viene ripetuto. I microsatelliti possono essere perfetti, composti o interrotti (Jarne et al., 1996), i primi sono costituiti da un solo tipo di modulo ripetuto, i secondi hanno uno o più tipi di moduli ripetuti e gli ultimi hanno tra un tipo di modulo ripetuto e l'altro una sequenza che li interrompe.

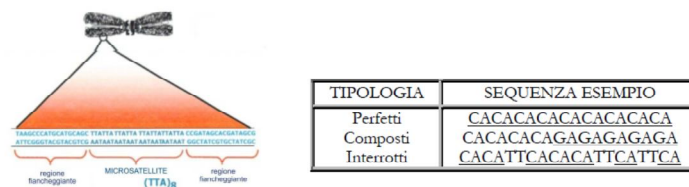


Figura 5. Tipologie differenti di microsatelliti.

Il DNA viene amplificato grazie all'utilizzo di primers progettati per poter essere complementari alle regioni fiancheggiante le

sequenze ripetute, altamente conservate e specifiche per la specie oggetto di studio (Morgante e Olivieri, 1993). Non è stata ancora del tutto chiarita la funzione all'interno del genoma di queste ripetizioni. Per quanto concerne quelle situate all'interno delle regioni codificanti si è ipotizzata una funzione nella regolazione della trascrizione dei geni ad essa adiacenti. Le regioni intergeniche invece, non essendo soggette a pressioni selettive, risultano estremamente variabili e quindi di estrema utilità nella caratterizzazione di specie, negli studi di dinamica di popolazione e negli studi filogenetici (Grassi *et al*, 2006).

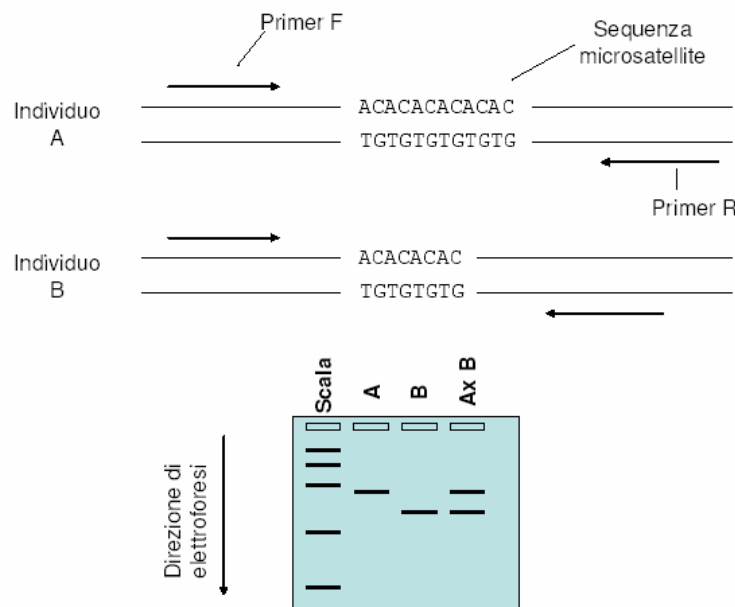


Figura 6. Esempio di sequenze microsatellite differenti su due diversi individui della stessa specie.

I microsatelliti presentano un elevato tasso di mutazione, 10^3 - 10^5 per gamete, a causa di appaiamenti errati tra filamenti complementari durante la replicazione o riparazione del DNA dovuto a Slipped Strand Mismatching (SSM), evento intra-elica.

Tra i microsatelliti dinucleotidici è stata particolarmente investigata la ripetizione TG, localizzata soprattutto nelle regioni eucromatiche la quale presenta un certo grado di conservazione tra

specie correlate. Questa ripetizione si ipotizza che possa avere un ruolo nell'espressione genica andando ad interferire sul cambiamento della conformazione del DNA da B a Z-DNA (quest'ultimo sarebbe coinvolto nell'attivazione dei geni). L'altra ipotesi che è stata avanzata è che queste ripetizioni possano essere dei siti caldi per la ricombinazione omologa e contribuiscano all'evoluzione della popolazione (Pardue *et al.*, 1987). Un'altra ipotesi sostiene che queste regioni abbiano il compito di accumulare mutazioni le quali avrebbero conseguenze negative se colpissero il DNA trascritto.

- ❖ ISSR: vengono amplificate porzioni di DNA tra due microsatelliti (Inter Simple Sequence Repeat) con primers, ancorati al microsatellite, disegnati in modo da avere, oltre alla sequenza ripetuta, anche fino a quattro basi oltre il microsatellite.
- ❖ AFLP: unendo le tecniche di rivelazione dei RFLP e RAPD vengono amplificati frammenti (Amplified Fragment Length Polymorphism) di DNA derivati dalla digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione. Il polimorfismo può essere dovuto a riarrangiamenti del DNA che provocano la perdita o la creazione di siti di restrizione, cambiamenti nella sequenza riconosciuta dai primers oppure variazione della lunghezza del frammento.
- ❖ SNP: evidenzia il polimorfismo dovuto a differenze di singoli nucleotidi (Single Nucleotide Polymorphism). Sono maggiormente rilevabili nelle regioni introniche, non trascritte, in quanto qui vengono maggiormente tollerate le mutazioni. Gli SNP vengono identificati grazie a primers specifici che vanno a rilevare la presenza di sequenze già note che vengono poi amplificate, sequenziate e quindi allineate per evidenziare le differenze dovute a mutazioni puntiformi. Gli SNP sono i marcatori a più alto potenziale di polimorfismo genomico rilevabile, dato l'elevato tasso delle mutazioni puntiformi.

3. INTRODUZIONE AL GENERE *CISTUS*



3.1 Fitognosia delle Cistaceae

La famiglia è formata da specie arbustive, basso-arbustive e erbacee caratteristiche di un ambiente arido e assolato (Proctor, 1978). Nel complesso comprende 8 generi: *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Tuberaria*, *Helianthemum*, *Hudsonia* e *Lechea* per un totale di 175 specie (Arrington e Kubitzki, 2003; Dansereau, 1939; Guzman e Vargas, 2009; Janchen, 1925).

La famiglia ha essenzialmente una distribuzione circum-mediterranea (sono presenti circa 100 specie), in particolare nella parte occidentale del bacino. Tutte le specie dei generi *Cistus*, *Fumana*, *Halimium* e *Tuberaria*, sono distribuite quasi esclusivamente nella zona mediterranea (Dansereau, 1939; Greuter *et al.*, 1984) insieme a circa la metà delle 110 specie di *Helianthemum*, le restanti sono distribuite in Europa e in Nord e Sud America (Meusel, 1978). Gli ultimi due generi, *Hudsonia* e *Lechea*, sono rappresentati da un totale di 20 specie distribuite nel continente americano.

Le relazioni filogenetiche all'interno della famiglia non sono state ancora del tutto chiarite. I possibili raggruppamenti sono stati proposti da Janchen (1925), Takhtajan (1987) e sono anche stati valutati raggruppamenti basati sulla variabilità pollinica (Ukrainseva, 1993). Guzman e Vargas (2005) hanno enunciato una prima ipotesi filogenetica basata sull'analisi delle sequenze del DNA plastidiale e nucleare per 20 specie della famiglia per ricostruire la radiazione adattativa delle specie Mediterranee di *Cistus* (Guzman e Vargas, 2009). Questi autori non presero per niente in considerazione la classificazione fatta da Ukrainseva (1993) basata sull'analisi dei pollini delle varie specie della famiglia, in cui si concludeva che *Tuberaria*, *Halimium* e *Cistus* appartengono allo stesso tipo pollinico. Questa classificazione, ritenuta troppo semplicistica, fu comunque un primo passo per i successivi studi paleoecologici e paleofloristici.

Le Cistaceae sono caratterizzate da foglie alternate o opposte, semplici, spesso revolute, peduncolate o sessili, stipulate o non; con venatura pennata, palmata o mono-nervia o parallelinervia.

I fiori sono solitari o raggruppati a formare un'infiorescenza, ermafroditi, attinomorfi, ipogini, casmogami o cleistogami. Il fiore, generalmente, si apre soltanto in pieno sole e per poche ore e i petali sono tipicamente effimeri. I sepali sono 3 o (4)5, quando sono 5 gli altri 2 sono

spesso simili a brattee, più stretti o più corti; il calice è irregolare (per forma e variabilità del numero di sepali) e questo risulta essere un carattere distintivo per la famiglia. I petali sono gialli, bianchi o rossastri (marroni, rosa, fucsia, arancio), liberi, 3(5) o assenti (fiori cleistogami), convoluti nella gemma, nella direzione opposta dei sepali, effimeri o raramente marcescenti; gli stami sono numerosi, 3-10, con filamenti distinti; le antere sono basifisse, introrse, tetrasporangiate, biloculari all'antesi, deiscenti longitudinalmente (apicalmente nei fiori cleistogami); il gineceo è (2)3-5(6-12)-carpellato; l'ovario è 1- o (2)3-5(6-12)-loculare a causa dell'intrusione della placenta parietale. La placenta è filiforme, il funicolo è ben sviluppato, lo stilo è semplice, lungo o molto corto o mancante, lo stigma è largo, capitato o discoidale, spesso lobato, a volte minuto o raramente fimbriato-plumoso.

I fiori delle Cistaceae generalmente non producono nettare, alcune specie del genere *Cistus* producono una piccola quantità di nettare, mentre *Cistus ladanifer* ne produce in abbondanza (Talavera *et al.*, 1993). Il rapporto polline/ovuli rientra nel range caratteristico della xenogamia (Bosch, 1992). Molte Cistaceae posseggono filamenti sensibili al tatto, al contatto con insetti gli stami si ripiegano verso l'esterno favorendo il contatto con essi e lasciando lo stigma esposto.

Le capsule sono luculicide con (2)3-5(6-12) valve, dritte o pendenti, con pochi o molti semi, spesso racchiuse da sepali persistenti.

I semi sono molto piccoli, racchiusi in due tegumenti, quello più esterno è molto sottile, spesso gelatinoso, il più interno molto duro; l'endosperma è amidaceo, nucleato, con pareti sottili. I due tegumenti conferiscono una particolare resistenza meccanica al seme grazie alle cellule a palizzata lignificate nell'esoderma e alle pareti delle cellule radiali e tangenziali dell'endoderma inspessite. Nella parte prossimale del seme l'esotegumento si ripiega a forma di cupola, qui si registra un elevato tasso di differenziazione (Corner, 1976; Nandi, 1998a), caratteristica tipica delle Malvales. L'embrione è ricurvo, piegato a gancio o ad anello, più o meno circinato e spiralato, plicato o biplicato, raramente diritto, in posizione centrale o più o meno periferico; i cotiledoni sono stretti, di forma ellittico-orbicolare, fortemente piegati. La sua particolare morfologia conferisce al seme delle Cistaceae una particolare resistenza alle aggressioni meccaniche e alla perdita di acqua, adattamento alla

siccità estiva e agli incendi accidentali, condizioni tipiche della regione Mediterranea (Thanos *et al.*, 1993; Gonzalez-Rabanal e Casal, 1995; Perez-Garcia *et al.*, 1995).

Nella famiglia possono essere osservati vari tipi di pubescenza, nel calice, negli stami e nelle foglie; i peli possono essere ghiandolari, pluricellulari capitati o allungati, o non ghiandolari, unicellulari, a ciuffi, a forma di stella. La pubescenza a forma di stella è stata classificata come 'falsa bicellularità' in quanto risultano comunque essere tricomi unicellulari, come similmente avviene nelle Combretaceae, che traggono in inganno per la presenza di una membrana conica o concava all'interno della parete cellulare (Grosser, 1903; Metcalfe e Chalk, 1950). Questa disposizione dei tricomi è un carattere distintivo delle Cistaceae.

3.1.1 Cariologia

Il numero di cromosomi è variabile all'interno della famiglia: $X=5, 7, 9-12, 16, 18, 20, 24$. Nell'evoluzione della famiglia ha giocato un ruolo importante l'aneuploidia e la poliploidia. Il genere *Cistus* ha $n=9$ con cromosomi (sub)metacentrici e un cariotipo simmetrico (Markova, 1975).

3.1.2 Riproduzione

Già Janchen nel 1925 aveva osservato l'autoincompatibilità nel genere *Cistus* e più di recente è stata rilevata nel genere *Cistus*, *Halimium* e *Helianthemum* (Brandt e Gottsberger, 1988; Bosch, 1992; Herrera, 1992; Talavera *et al.*, 1993,1997). Questa strategia riproduttiva, promuovendo la fecondazione tra individui non relazionati filogeneticamente, contribuisce a creare variabilità genetica. Abbastanza comune risulta l'ibridazione intergenetica tra il genere *Cistus* e *Halimium*, circa dieci specie sono state poste all'interno del genere ibrido *X Halimiocistus* (Dansereau, 1939).

3.1.3 Fitochimica

Le Cistaceae contengono glicosidi di comuni flavonoidi quali la miricetina e altri flavonoli oltre a tannini condensati e idrolizzabili. Soprattutto il genere *Cistus* è stato studiato a livello fitochimico per l'interesse riversato verso i metaboliti secondari in esso presenti. Le foglie del genere contengono

diversi flavonoidi lipofili e per la maggior parte metilati. Diverse specie di cisti secernono un balsamo, ladano o labdano, un complesso di diversi oli eterei e resine, per il resto si tratta di vari diterpeni, esteri e triterpeni. I peli ghiandolari di diverse specie secernono un potente antimicotico composto da tannini condensati (Bechi *et al.*, 1994).

3.2 Fitognosia del genere *Cistus*

Per quanto riguarda il genere *Cistus* la sua tassonomia è stata tradizionalmente basata su caratteri vegetativi (nervatura, forma e pubescenza fogliare) e riproduttivi (numero di sepali, colore dei petali, lunghezza dello stile e numero di valve del frutto). Le monografie del genere riconoscono dalle 18 (Grosser, 1903) alle 28 specie (Dunal, 1824), gli ultimi studi riportano circa 20 specie, 16 si ritrovano in Europa (Warburg, 1968), 11 in Spagna (Martín e Guinea, 1949), 12 in Iberia (Demoly e Montserrat, 1993), e 12 in Marocco (Soriano, 2002). La parte occidentale del Mediterraneo è quella che presenta la più elevata diversità, 16 specie sono distribuite dalla penisola iberica al nord-ovest dell'Africa.

Nell'ultimo studio tassonomico (Demoly e Montserrat, 1993) le specie sono state raggruppate in tre sottogeneri in base a caratteri morfologici: *Cistus*, *Leucocistus* e *Halimioides*. Il subgenere *Halimioides* è distribuito, con le sue tre specie, nella parte occidentale del Mediterraneo, i sottogeneri *Leucocistus* e *Cistus*, invece sono distribuiti, rispettivamente con otto e nove specie, dal bacino del Mediterraneo alle isole Canarie. Le varie specie del genere crescono facilmente in suoli ben drenati, inclusi i calanchi, in cui resistono nelle zone completamente assolate.

L'ampia distribuzione del sottogenere *Cistus* fornisce una chiara indicazione riguardo la mobilità dei suoi semi e il successo di colonizzazione dell'habitat mediterraneo, d'altra parte il meccanismo evolutivo, responsabile della differenziazione morfologica e dell'adattamento a nicchie ecologiche differenti, non è stato investigato. Il genere è caratterizzato da un'auto-incompatibilità, caratteristica che promuove l'incrocio tra piante della stessa o di differente specie. L'unione di individui di specie differenti porta alla formazione di individui ibridi con caratteristiche intermedie rispetto a quelle dei genitori, soprattutto se quest'ultimi appartengono alla stesso cogenere

(Demoly, 1996). L'alloploidia non ha giocato un ruolo cruciale nella speciazione del genere, come in tutte le specie con numero di cromosomi $2nD18$, infatti si può constatare che la variazione nel contenuto di DNA non è significativo tra le specie (Ellul *et al.*, 2002).

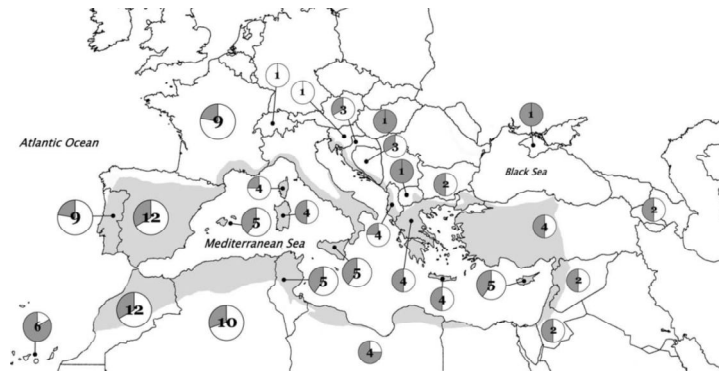


Figura 7. Distribuzione del genere *Cistus*. In grigio è stata evidenziata la regione mediterranea. I diagrammi a torta mostrano la distinzioni tra specie con fiori bianchi (porzione bianca) e con fiori viola (porzione grigia).

Lo studio delle relazioni filogenetiche indica che la famiglia appartiene alla stessa linea evolutiva delle Dipterocarpaceae e delle Sarcocaulaceae (Soltis *et al.*, 2000) e che il genere *Cistus* è affine a *Halimium* e *Helianthemum* (Arrington e Kubitzki, 2003; Savolainen *et al.*, 2000), ma malgrado queste indicazioni resta ancora poco chiaro il processo evolutivo della specie e il legame filogenetico tra le Cistaceae e il genere *Cistus*.

Il genere è formato da specie arbustive, molte delle quali producono una secrezione aromatica e resinifera.

Le foglie sono ellittiche o lanceolate (5-10 volte più lunghe che larghe), parallelinervie o con nervature pennate, sessili o peduncolate, tomentose o glabre, con pubescenza stellata o ghiandolare (foglie vischiose).

I fiori sono generalmente disposti in cime, raramente solitari, di colore bianco o viola-rosso a seconda della specie, i sepali sono 3-5, i petali 5, l'ovario è formato da 5-10 loculi e le capsule sono suddivise in 5 parti, raramente 6-12, la placentazione è assile, gli ovuli sono ortotropi e il funicolo filiforme.

I semi, come già si è accennato per la famiglia di appartenenza del genere, sono termoresistenti e molto piccoli. In genere le piante risultano fortemente predisposte all'incendio, ma grazie alla peculiarità di essere pirofite

attive generative, il seme resiste al fuoco e dopo di esso le piante si rinnovano in massa. Sono proprio le alte temperature che favoriscono la rottura dei duri tegumenti del seme, in particolare quelli interni, che garantiscono, al passaggio del fuoco, la dormienza fisica e la perdita di acqua. Oltre alla barriera formata dai tegumenti il seme possiede sostanze fenoliche che sembra limitino il normale flusso di ossigeno verso l'embrione. Malgrado la resistenza del seme alle elevate temperature, per la germinazione sono necessarie temperature abbastanza esigue, intorno ai 17°C, sintomo di adattamento al clima mediterraneo e quindi ad uno sviluppo della pianta durante periodi freschi e umidi caratterizzati da minimo rischio di incendi (autunno, inverno).

SPECIE ITALIANE

Cistus albidus L. (VEN, LIG, TOS, SAR e Corsica); *Cistus crispus* L. (SIC); *Cistus incanus* L. (VEN, LIG, EMR, TOS, UMB, MAR, ABR, LAZ, ABR, MOL, CAM, BAS, PUG, CAL, SIC, SAR e Corsica); *Cistus corsicus* Loisel. (SAR e Corsica); *Cistus creticus* L. (TOS, CAM, PUG, CAL, SIC, SAR); *Cistus parviflorus* Lam. (Lampedusa); *Cistus monspeliensis* L. (LIG, TOS, LAZ, ABR, CAM, BAS, PUG, CAL, SIC, SAR e Corsica); *Cistus salviifolius* L. (presente in tutta Italia escluso TAA); *Cistus laurifolius* L. (TOS e Corsica); *Cistus ladanifer* L. (coltivato); *Cistus clusii* Dunal (PUG, CAL, SIC).

4. *CISTUS LAURIFOLIUS* L.



Classe	Magnoliopsida
Ordine	Violales
Famiglia	Cistaceae
Genere	Cistus
Specie	<i>C. laurifolius</i>

Sinonimi: *Ladanium laurifolium* (L.) Spach

Tipo: Steno-mediterraneo con disgiunzione tra occidente e oriente.

Nomi comuni: Cisto maggiore, Cisto a foglie di Lauro, Cisto laurino, Erba della Madonna (Santa Brigida –FI).

4.1 Morfologia

Specie medio arbustiva (150-200 cm di altezza) con rami eretti a formare un denso cespuglio sempreverde. Tra i cisti italiani è facilmente riconoscibile poiché la sua formazione arbustiva risulta essere quella di maggiori dimensioni, caratteristica che gli ha fatto meritare il nome comune di cisto maggiore. I rami, sempre indirizzati verso la ricerca di luce, sono di due tipi: macroblasti e brachiblasti. I giovani rami sono ricoperti di secreto resinoso prodotto da una pubescenza ghiandolare che poi scompare durante la crescita. Solo prima del germogliamento compaiono le gemme a crescita libera (Vogt e Gülz, 1994) ridotta nel tempo in quanto la specie germoglia a maggio e termina la sua crescita durante la prima aridità estiva (Milla *et al*, 2004; 2005).

Le foglie sono sempreverdi, opposte e decussate, semplici e di dimensioni abbastanza elevate a confronto con le altre specie del genere, sono lunghe 3-8(9) cm e larghe 10-30 mm con un picciolo di 7-20 mm che si inguaina al ramo. La lamina risulta ovato-lanceolata, terminante con un apice allungato a punta, presenta una nervatura centrale più marcata e altre due, decorrenti parallelamente, più attenuate, e una vistosa pubescenza; il margine è intero e ondulato, la pagina superiore è di un brillante verde scuro, mentre quella inferiore è più o meno bianca, a secondo dell'età della foglia, per la presenza di una fitta peluria a protezione dei sottostanti peli ghiandolari.



Figura 8. Immagini rappresentanti le diverse parti anatomiche di *Cistus laurifolius*.

I fiori sono ermafroditi e abbastanza grandi, 4-6 cm di diametro, attinomorfi, con corolla formata da 5 petali bianchi, numerosi stami gialli e un breve stilo. Il calice è formato da 3 sepali pubescenti e verdi. I fiori sono raccolti in infiorescenze di 4-8 fiori, cimose e ombrelliformi lungamente pedunculato. Le infiorescenze compaiono insieme ai germogli (Milla *et al.*, 2005), i fiori sono piuttosto effimeri, durano uno-due giorni per poi appassirsi.

I frutti sono capsule loculicide, legnose di circa 10 mm di diametro, rotondeggianti o allungati, più o meno appuntiti all'apice. Esternamente sono pubescenti, mentre all'interno sono suddivisi in 5 logge che a maturità si aprono per liberare i semi. I semi sono numerosi, circa 10 per loggia, scuri, sferici, molto piccoli, circa 1 mm di diametro.

4.2 Areale di distribuzione

Il cisto laurino è una specie con areale stenomediterraneo distribuito dal Marocco alla penisola iberica e dalla Francia meridionale alle regioni dell'Egeo settentrionale alla penisola anatolica. L'unica stazione di transito, tra la distribuzione occidentale e orientale, è quella di Santa Brigida (Italia, Toscana, Comune di Pontassieve) che quindi finisce per costituire la più importante ai fini della comprensione delle dinamiche filogeografiche e degli

eventi legati alle migrazioni postglaciali (era nota una stazione in Corsica, nella foresta di Marmano presso Ghisoni ma già Greuter *et al.* (1984) ne ritenevano dubbio l'indigenato e, recentemente, Jeanmonod e Gamisans (2007) l'hanno citata come stazione di chiara origine antropica).

Inoltre, proprio per questa peculiarità il cisto di Santa Brigida fa parte dell'elenco delle «Specie meritevoli di conservazione presenti nel territorio regionale della Toscana» (archivio Re.Na.TO.) nonché degli allegati A3 («Specie vegetali di interesse regionale, la cui conservazione può richiedere la designazione di SIR») e C («Specie vegetali protette») della L.R. 56/2000 sulla biodiversità e successive modifiche (Del. C.R. 68/2005). La specie è inoltre menzionata nel Libro Rosso delle piante d'Italia (Conti *et al.*, 1992) e nelle Liste Rosse Regionali delle piante d'Italia (Conti *et al.*, 1997) dove è definita come specie «in pericolo critico». La vegetazione a dominanza di cisto laurino della stazione di Santa Brigida è stata anche censita come fitocenosi di interesse regionale con la denominazione "Arbusteti a *Cistus laurifolius* di S. Brigida".

In una Comunicazione del Presidente della Società Botanica Italiana, S. Sommier, nell'adunanza del 12 febbraio 1899, si ritrovano le segnalazioni di altre popolazioni italiane di *Cistus laurifolius*. Il presidente ritiene che sia stata menzionata la specie per la prima volta nel 1768 in tre lettere dirette da Ferdinando Bassi, prefetto dell'Orto Botanico di Bologna, all'abate G.B. Guatteri, prefetto dell'Orto Botanico di Padova. In queste si riporta che a quel tempo la specie era abbondantemente presente nei Colli Euganei per poi essere osservata nel 1804 da Sternberg prima e dodici anni dopo da Ciro Pollini, sul Monte Venda. Quest'ultimo lo raccolse in cospicua copia tanto che a tutt'oggi non esiste più segnalazione della specie in quest'area. Nel 1785 Carlo Allioni (Flora Pedemontana, 1785) indica la presenza del cisto nei colli vicino Bistagno, ma anche qui non è stato più ritrovato. Nel 1780 padre Bernardino da Ucria lo segnala in Sicilia nel suo Hortus Regius Panormitanus (1789), ma la vaga descrizione e la mancanza di segnalazioni successive fanno ritenere dubbia la presenza. Non viene mai nominato nella Flora di Bertoloni (Flora italica sistens plantas in Italia et in insulis circumstantibus sponte nascentes, 10 voll., Masi, Bologna 1833-1854) e di Parlatore (Flora italiana: ossia, Descrizione delle piante che crescono spontanee o vegetano come tali in Italia e nelle isole ad essa adiacenti; disposta secondo il metodo naturale, Tip. Le Monnier, 1867) lo

segnalano in Italia solo Fiori e Paoletti nella Flora analitica d'Italia (1896-1908), omettendo l'indicazione di Ucria. Per la Toscana la Marchesa Paolucci-Panciatichi osservava che il cisto cresceva piuttosto abbondante nel Parco della Villa Panciatichi a Sammezzano presso Rignano in Valdarno, questa segnalazione fu poi citata anche da Baroni nel Supplemento generale al Prodromo della Flora Toscana di T. Caruel (Firenze, 1897), come pianta di recente introduzione.

Nella stessa Comunicazione alla Società si riporta che lo stesso Sommier nel percorrere i monti che fanno da spartiacque tra il Mugello e la Val di Sieci ne ritrovò un'abbondante popolazione, costituita anche da giovani piante, a partire dall'abitato di Santa Brigida per un chilometro verso Monte Rotondo passando per il cimitero del paesino (area in cui oggi si è potuta attestare la presenza di soli 10 esemplari): «...non lungi dalla Madonna del Sasso, fummo non poco meravigliati di trovarvi in gran copia il *Cistus* in questione. Per quanto potemmo allora assodare, se ne trovano le prime piante poco sopra Santa Brigida e si seguiva a trovarlo abbondante per quasi un chilometro, quando da quella borgata si va, passando per il camposanto, nella direzione di Monte Rotondo, in terreni per la maggior parte di proprietà dei signori Martini Bernardi, ad un'altezza di circa 450 a 550 m. L'area che occupa è tanto estesa, e la sua frequenza è tale, che non ho il minimo scrupolo d'indicare la località esatta, sicuro che nessun raccoglitore di specie rare, per quanto fanatico esso sia, ve lo potrà estirpare, come dicesi che abbia fatto il Pollini sui colli Euganei. Esso mostrava di aver fiorito abbondantemente e portava capsule dalle quali erano già per la maggior parte caduti i semi. Accanto agli arbusti vecchi, con tronchi legnosi più o meno decumbenti, si vedevano prosperare in quantità giovani piantine di seme erette. Esso cresce insieme al *Cistus salviifolius* L. nella macchia e sotto i boschi di castagno e di querce. Interrogati i contadini dei dintorni, abbiamo potuto accertarci che conoscono benissimo questa pianta ed i bei fiori bianchi di cui si cuopre in estate, che l'hanno sempre conosciuta, e che le danno il nome di "erba della Madonna", perché con essa adornano gli altari della Vergine nelle feste di Maggio e di Giugno. Essi ci dissero che cresceva soltanto nell'area sulla quale l'avevamo osservata, e non si estendeva sui monti nè a destra nè a sinistra.».

Sommier ne ipotizza il carattere indigeno proprio per la sua copiosità, per il fatto che i contadini del posto da sempre ne attestano la presenza e per le condizioni ecologiche dell'area immutate da lungo tempo; lui stesso lo definisce come "fossile vivente".

4.3 Storia

Tutta l'area di Santa Brigida è permeata da un'aura di sacralità risalente al periodo etrusco quando la cima del Monte Giovi era la sede di un santuario. Più tardi nel X secolo il piccolo abitato fu luogo di eremitaggio, tutt'oggi è conservata la grotta dove si ritirò in preghiera, della mistica Santa Brigida. Nel 1400 la zona fu invece caratterizzata da un'intensa devozione alla Vergine Maria che apparve, con Gesù Bambino in braccio, alle due pastorelle Ricovera che si erano recate nella zona in cui oggi sorge il Santuario della Madonna del Sasso, eretto in suo onore, a pregare per la guarigione del padre. Proprio la devozione alla Madonna e la fioritura del cisto coincidente con il mese di maggio fecero nascere la correlazione tra la pianta e il culto sottolineata dall'epiteto assegnato alla specie "fiore della Madonna".

4.4 Ecologia

Cistus laurifolius cresce in ambienti luminosi e asciutti, su suoli subacidi, ma si può ritrovare anche in terreni alcalini, e oligotrofici. In particolare l'esigenza di luce diretta risulta essere il fattore maggiormente limitante il suo sviluppo e questo lo porta a colonizzare spazi privi di vegetazione arborea densa, ma caratterizzati da specie erbacee e basso-arbustive. Questa esigenza, insieme al carattere da specie spiccatamente pirofita, lo porta ad essere una tra le specie pioniere negli ambienti appena attraversati da incendi o disboscamenti.

5. SCOPO DEL LAVORO



La ricerca ha avuto lo scopo di investigare caratteristiche morfologiche, molecolari e fitochimiche di *Cistus laurifolius*, analizzando e comparando gli individui di provenienza italiana con quelli spagnoli.

L'intento principale è stato quello di indagare lo stato della variabilità della popolazione italiana. Le informazioni raccolte dall'analisi della morfologia fogliare, dei microsatelliti nucleari e plastidiali sono state utilizzate con lo scopo di conoscere il processo di espansione, di possibile origine naturale o antropica, che ha portato il cisto a insediarsi nell'areale italiano soltanto a Santa Brigida. Una volta chiarite le dinamiche di colonizzazione della specie queste possono costituire un'utile informazione per progettare e mettere in campo interventi di gestione e conservazione di *Cistus laurifolius*. Infine i dati ricavati dall'analisi fitochimica e dai test *in vitro*, volti a saggiare le possibili proprietà medicinali, sono state utilizzate per presentare un profilo completo della specie, comprensivo delle sue peculiarità fitoterapiche, al fine di poter fornire un risvolto applicativo alla ricerca.

Riassumendo, i campi di indagine sono stati i seguenti:

-**caratterizzazione morfologica** comparata della popolazione di Santa Brigida e di tre differenti popolazioni spagnole;

-**sviluppo e analisi dei marcatori molecolari nucleari** al fine di mettere in luce possibili differenze genetiche all'interno della stessa popolazione toscana o tra questa e le altre dell'areale di distribuzione;

-**analisi dei marcatori plastidiali**, volta ad indagare la variabilità a livello del genoma plastidiale della popolazione toscana, attraverso l'analisi comparata dei loci genetici del cisto di Santa Brigida e delle differenti provenienze spagnole;

-**caratterizzazione fitochimica** della specie per una completa caratterizzazione della popolazione e per analizzare il loro possibile impiego a fini fitoterapici.

5.1 Caratterizzazione morfologica

La morfometria classica analizza variabili lineari delle foglie e le confronta statisticamente tra di loro al fine di poter fornire un dato riguardante la diversità biologica tra individui in questo caso appartenenti alla stessa specie, ma di diverse provenienze geografiche. In questo tipo di studi individuare una

differenza, statisticamente significativa, nella dimensione o nella forma tra gli individui delle differenti popolazioni, porta ad individuare un tasso di differenziazione, all'interno della specie, da relazionare poi o ad un differente adattamento ad ambienti diversi o ad una eventuale variabilità genetica.

Storicamente la classificazione tassonomica degli organismi e lo studio della diversità delle strutture biologiche si sono basate sulla descrizione morfologica delle forme. All'analisi qualitativa si è poi affiancato un approccio quantitativo attraverso lo sviluppo di metodi statistici quali il coefficiente di correlazione (Pearson, 1895), l'analisi della varianza (Fisher, 1935) e l'analisi delle componenti principali (Pearson, 1901; Hotelling, 1933). A partire dai primi anni '90 si è assistito ad una nuova evoluzione della materia con all'avvento della morfometria geometrica (Rohlf e Marcus, 1993) con cui si riesce a mettere in luce le variazioni di dimensioni con la forma.

Nel caso particolare della specie oggetto di studio abbiamo ritenuto necessario indagare la variabilità morfologica fogliare tra individui della stessa popolazione di Santa Brigida, appartenenti a 5 subpopolazioni differenti, e tra questi e quelli prelevati in tre differenti popolazioni spagnole. L'approccio seguito è stato quello dello studio morfologico tradizionale abbinato ad un'indagine statistica multivariata. Inizialmente è stato tentato anche un approccio di analisi con le tecniche di morfometria geometrica, ma la particolare conformazione della foglia di cisto, in particolare il suo margine ondulato, ha reso difficoltosa l'indagine e non ha permesso una chiara interpretazione dei dati. Si è voluto comunque lasciare aperto questo filone di indagine, innovativo ma anche estremamente utile soprattutto per valutare le differenze allometriche tra individui.

L'individuazione di differenze a livello morfologico d'altra parte non possono essere considerate sufficienti per testimoniare una variabilità biologica. A tal proposito l'analisi della morfologia fogliare è stata supportata da una più predittiva analisi molecolare, nella fattispecie dallo studio della variabilità a livello di marcatori molecolari nucleari.

5.2 Sviluppo e analisi dei marcatori molecolari nucleari

Per studiare lo stato della variazione genetica all'interno dell'unica popolazione italiana di cisto maggiore e conseguentemente tra questa altre tre

popolazioni rinvenute in Spagna, il primo passaggio della ricerca è stato quello di predisporre dei marcatori SSR nucleari validi per la specie. Non essendo disponibili è stato necessario progettare *ex novo* dei marcatori che fossero validi.

5.3 Analisi dei marcatori plastidiali

Abbiamo voluto ricercare anche la possibile presenza di variabilità all'interno di un genoma ad eredità uniparentale (ereditato per via materna nelle angiosperme), maggiormente informativo ai fini di studi filogeografici e filogenetici (Petit e Vendramin, 2007), quello plastidiale. Per questo motivo sono stati testati, sulla popolazione toscana e sulle tre popolazioni spagnole, dei microsatelliti plastidiali universali (Weising e Gardner, 1999) e quelli sviluppati per le Fagaceae (Sebastiani *et al.*, 2004).

5.4 Caratterizzazione fitochimica

La conoscenza di una specie non può esulare da quella che è l'analisi dei metaboliti secondari da essa prodotti. Nelle specie vegetali quando si parla di metaboliti secondari ci si riferisce quei costituenti non strettamente legati al ciclo vitale della pianta, come a terpeni, fenilpropanoidi, polifenoli, per la maggior parte derivati dall'amminoacido fenilalanina attraverso la via dell'acido shikimico e alcaloidi, composti azotati derivati dagli amminoacidi.

Per quanto riguarda la specie di nostro interesse sono stati fatti alcuni studi fatti al fine di indagare i metaboliti presenti nelle foglie, parte della pianta a cui sono ascritte le proprietà biologiche, compito assai arduo, non esistendo in letteratura ricerche atte a fornire un profilo fitochimico completo della specie.

I tricomi ghiandolari fogliari di *Cistus laurifolius* secernono un essudato consistente, principalmente di terpenoidi e flavonoidi metilati (Wollenweber e Mann, 1984; Vogt, Proksch e Gulz, 1987).

Il profilo polifenolico dell'estratto metanolico di *Cistus laurifolius* (Sadhu *et al.*, 2006), è stato investigato ed è risultato fitochimicamente diverso dall'estratto acquoso. Uno studio del gennaio 2011 (Barrajón-Catalán *et al.*, 2011) ha condotto un'identificazione dei composti polifenolici presenti in estratti acquosi di varie specie del genere *Cistus*. Ne è emerso che nella specie di nostro interesse sono presenti acido gallico, punicalina, ellagitannini,

punicalagina e punicalagina gallato, pedunculagina oltre a vari flavonoidi quali flavonol(-)-(epi)gallocatechina, flavonoli quali quercetina, miricetina ramnoside, quercetina glucoside e miricetina exoside.

L'interesse fitochimico è strettamente legato al fatto che alcune specie del genere *Cistus* sono state elevate al rango di farmacologicamente attive dalla tradizione e dalla recente letteratura scientifica. La medicina tradizionale ha da tempo utilizzato varie specie del genere *Cistus* come antiinfiammatorie, antiulcerogeniche, per la riparazione tissutale, come antimicrobiche, citotossiche e vasodilatatori. Nella medicina tradizionale turca varie parti della pianta di *Cistus laurifolius*, comune nella penisola anatolica, vengono utilizzate per il trattamento dell'ulcera peptica, per vari tipi di dolori reumatici quali il mal di schiena (Yesilada, 2001) e in varie patologie infiammatorie (Yesilada *et al.*, 1997). Lo stesso autore ha descritto come un estratto di foglie posseda proprietà antiulcerogeniche, contro vari tipi di ulcere, nel ratto (Yesilada, 1997).

Studi recenti hanno indagato queste proprietà su alcuni estratti di cisto (De Andres *et al.*, 1999; Küpeli e Yesilada, 2007; Barrajon-Catalan *et al.*, 2010) e studi preliminari sono stati fatti anche su *Cistus laurifolius* mettendo in evidenza, nell'estratto etanolicco ricco in flavonoli, un'attività antiinfiammatoria e antinocicettiva (Küpeli e Yesilada, 2007). In uno studio del 2004 (Yesilada *et al.*, 2004) è stata indagata l'attività analgesica di quattro differenti estratti, etanolicco, metanolicco, acquoso e cloroformico, dimostrando un'attività analgesica, nel topo, dell'estratto cloroformico.

Sempre il gruppo di ricerca turco di Yesilada *et al.*, nel 2006, ha cercato di indagare la modulazione del livello di perossidazione lipidica (epatica e plasmatica), del glutatione cellulare (GSH) e degli enzimi plasmatici aspartato amminotransferasi (AST) e alanina amminotransferasi (ALT), da parte di un estratto di foglie di *Cistus laurifolius*, nei topi con danno epatico acetaminofen-indotto, dimostrando una potente attività antiossidante della quercetina-3,7-dimetiletere e del campferolo-3,7-dimetiletere, flavonoidi agliconi isolati nell'estratto.

D'altra parte, studi contrastanti arrivano da ricercatori spagnoli, i quali hanno evidenziato una non trascurabile tossicità di alcuni estratti di specie appartenenti al genere *Cistus*.

Vari articoli, tutti ad opera del gruppo di ricerca del Prof. Emilio Ballesteros Moreno (docente di farmacologia e Tossicologia presso la facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Saragozza), segnalano, al pari di altre specie del genere *Cistus*, la tossicità di *Cistus laurifolius*. Nelle pubblicazioni spagnole (Ballesteros Moreno *et al.*, 1969; Ballesteros Moreno e Hernández Gómez, 1969; Ballesteros Moreno, 1970; Ballesteros Moreno e Val Calvete, 1969; Ballesteros Moreno e García Poblete, 1970; Ballesteros Moreno e Montañes García, 1970; Ballesteros Moreno e Santamaría Borra, 1969; Ballesteros Moreno e Santamaría Borra, 1969; Ballesteros Moreno e Santamaría Borra, 1971; Ballesteros Moreno *et al.*, 1982; Ballesteros Moreno *et al.*, 1983) la specie viene descritta come tossica per ovini e caprini a cui può provocare attacchi epilettici, pollachiuria, albuminuria e ematuria e portare anche alla morte. Negli animali morti sono state osservate alterazioni epatiche e renali accompagnate da anemia.

Alla luce dei dati contraddittori presenti in letteratura, nel presente lavoro abbiamo voluto indagare qualitativamente e semi quantitativamente la componente dei metaboliti secondari della popolazione toscana di cisto e quindi avviare studi *in vitro* tesi ad indagare la sua tossicità e le proprietà farmaceutiche.

L'indagine fitochimica di *Cistus laurifolius*, svoltasi all'interno dell'U.O. di Biologia farmaceutica dell'Università degli Studi di Siena e del CNR-IGV di Sesto Fiorentino, è stata condotta su due differenti versanti, quello dell'analisi dei prodotti metabolici non volatili (polifenoli, terpeni e polisaccaridi) e di quelli volatili (oli essenziali) al fine di aver una caratterizzazione della specie più completa possibile. L'analisi della componente volatile è stata accompagnata anche da una comparazione con i prodotti dell'altra specie, dello stesso genere, presente a Santa Brigida, *Cistus salviifolius*, al fine di poter comprendere come uno stesso ambiente abbia potuto o meno influire su tale produzione.

Preliminarmente è stata studiato il sistema solvente capace di garantire la migliore estrazione dei costituenti biologicamente attivi e quindi sono state allestite le preparazioni di due differenti estratti per macerazione, da foglie fresche e da foglie essiccate e un terzo estratto ottenuto con la tecnica innovativa del Naviglio Estrattore.

Dopo aver ottimizzato la metodica di estrazione della droga, al fine di ottenere un estratto il più stabile possibile e che mantenga inalterate tutte le proprietà della specie, abbiamo voluto indagare il ruolo e il meccanismo d'azione dei metaboliti presenti nell'estratto.

5.5 Test *in vitro*

Per poter fare chiarezza sulla presunta tossicità della specie *Cistus laurifolius*, nel presente lavoro abbiamo voluto allestire due differenti test di tossicità. Preliminarmente è stato fatto un test della vitalità cellulare su linfomonociti umani al fine di ottenere una stima percentuale delle cellule morte dopo trattamento con due differenti estratti di cisto, quindi è stato valutato il danno alle membrane cellulari con il test della lattato deidrogenasi (LDH).

Contemporaneamente, in questo lavoro non è stata messa in secondo piano una prima e originale ricerca sulle proprietà farmacologiche di *Cistus laurifolius*. Per questo motivo, il passaggio successivo, partendo dai dati preliminari ottenuti con il test chimico del DPPH, che valuta efficacemente il potere antiradicalico di un prodotto, è stato quello di indagare *in vitro* su cellule tubulari renali, le proprietà antiossidanti, denominatore comune di tutte le patologie trattate con la specie dalla medicina tradizionale turca, di estratti idroalcolici di foglie di *Cistus laurifolius*. Diverse patologie hanno infatti come denominatore comune uno stato infiammatorio favorito dalla formazione di radicali liberi e quindi dallo stress ossidativo;

L'altra proprietà ascritta agli estratti di foglie di *Cistus laurifolius* è quella antimicrobica, a questo scopo è stato condotto uno screening preliminare su vari ceppi batterici e fungini tra quelli che più comunemente sono causa di infezione nell'uomo.

6. MATERIALI E METODI



6.1 Campionamento

Il campionamento è stato effettuato nell'arco temporale di due anni (2010-2012) nell'Area Naturale Protetta di Interesse Locale (ANPIL) –Poggio Ripaghera, Santa Brigida, Valle dell'Inferno, unico sito italiano in cui è a tutt'oggi segnalata la presenza della specie.

L'ANPIL è stata istituita con legge regionale n. 49 del 11/04/1995 dal Comune di Pontassieve con delibera del Consiglio Comunale n. 188 del 19/12/1997 per una superficie iniziale di 470 ha, successivamente ampliata a 817 ha con delibera del Consiglio Comunale n. 127 del 21/07/2000. L'area è gestita con apposito regolamento del Consiglio Comunale (D.C.C. n. 128 del 21/07/2000 poi modificato fino alla versione finale del 12/11/2010) e con Piano di gestione delle formazioni vegetali predisposto nell'aprile 2011 dall'incaricato Dott. Mario Vannuccini.

L'ANPIL di riferimento è localizzata nella parte nord-occidentale del Comune di Pontassieve, a confine con i comuni di Borgo San Lorenzo a nord e di Fiesole a ovest, compresa nelle sezioni 264090 e 264100 della Carta Tecnica regionale scala 1:10.000. All'area protetta risulta parzialmente sovrapposto anche il SIC IT5140009/SIR 43 "Poggio Ripaghera-Santa Brigida". L'area è localizzata nella parte sud-occidentale del comprensorio del Monte Giovi (992 m), spartiacque tra il Mugello e il Valdarno, occupando i versanti di Poggio Ripaghera (912 m), del Giogo (880 m), di Poggio Abetina (857 m) e di Monte Rotondo (773 m).

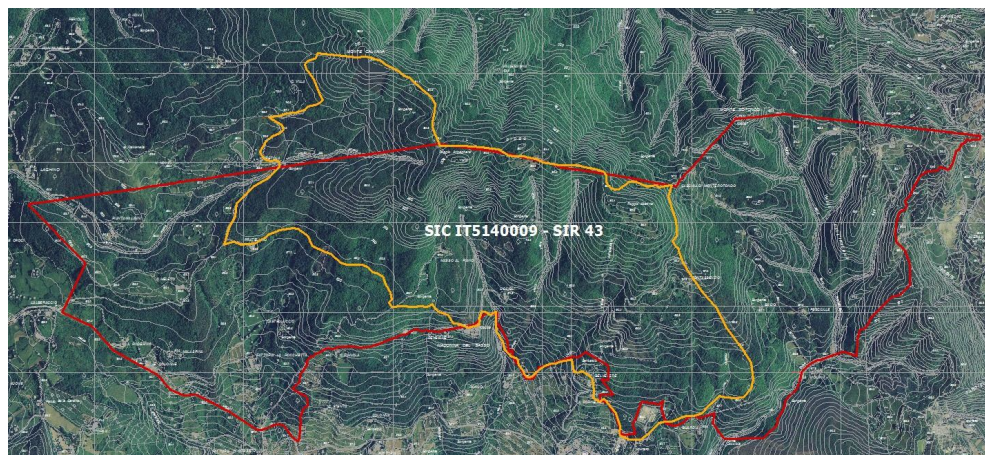


Figura 9. Rapporto fra ANPIL e SIC IT5140009 – SIR 43 "Poggio Ripaghera – Santa Brigida"

Geologicamente l'area è caratterizzata, nella parte occidentale, dall'affioramento di formazione calcaree quali l'Alberese e la Formazione di Sillano, che formano suoli alcalini e versanti con pendenze piuttosto elevate ma non aspri, dominati a livello vegetazionale, da boschi termofili di roverella e formazioni erbacee della classe Festuco-Brometea. La parte centrale è invece caratterizzata da substrati arenacei intercalati a formazioni plastiche e impermeabili, argille, marne e arenacee le quali presentano affioramenti e ammassi rocciosi, habitat di rifugio di *Cistus laurifolius*. I suoli risultano qui sciolti, da acidi a subacidi, caratterizzati da petrosità in superficie, caratteristiche che hanno favorito la coltivazione del castagno e la presenza di querceti con sottobosco di eriche e ginestre dei carbonai. La parte orientale dell'area, quella della Valle dell'Inferno, presenta la formazione del Macigno del Mugello con affioramenti di marne, argille e scisti siltosi che formano valli con versanti acclivi, soggetti ad erosione idrica abbastanza sostenuta. I suoli sono sciolti, da subacidi a debolmente alcalini, in cui ritroviamo ancora la coltura del castagno, ma intervallata a carpino bianco e a latifoglie mesofile.

Il clima può essere classificato come suboceanico alle quote più elevate e di tipo submediterraneo alle quote più basse con picco massimo delle precipitazioni in ottobre-novembre e minimo in luglio quando si raggiunge anche il massimo termico (mediamente 928 mm di pioggia/anno e 14,5°C).

A livello vegetazionale la superficie forestale ammonta a 753 ha, il 92% della superficie complessiva dell'area. Per la maggior parte i boschi sono castagneti (32%), seguiti da querceti (24%), boschi mesofili (16%) e arbusteti (12%), piccola percentuale (8%) è anche caratterizzata da rimboschimenti di conifere.

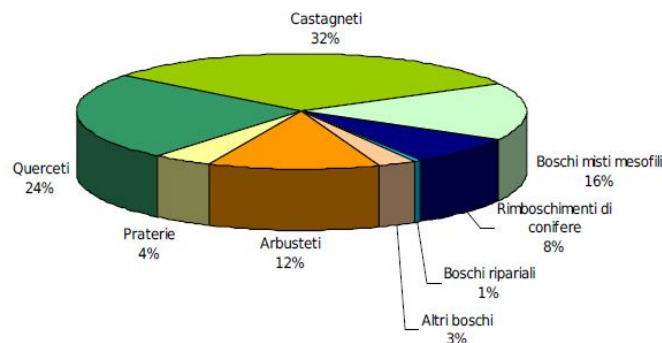


Figura 10. Tipologie vegetazionali caratterizzanti l'ANPIL.

Il tipo forestale in cui si ritrova la presenza di *Cistus laurifolius* è quello della Cerreta acidofila submediterranea a eriche, il Ginestreto di *Cytisus scoparius* (L.) Link, le macchie basse a eriche e le macchie basse a *Cistus*, quindi sono state queste le zone in cui è stato effettuato il campionamento per la ricerca oggetto dello studio.

- Cerreta acidofila sub mediterranea a eriche:

Questa tipologia forestale occupa solo il 2,3% della superficie forestale dell'ANPIL, si ritrova frammista ai castagneti, a bassa quota e nel versante sud-orientale di Poggio Abetina e a monte del sentiero 1 del CAI (Centro Alpino Italiano) presso il Santuario della Madonna del Sasso. Ritroviamo cedui presso il campo sportivo di Santa Brigida (frammisti a rimboschimenti di pino marittimo), presso la località La Guardia (insieme a *Quercus crenata* Lam.), nel sentiero D del CAI, la strada che porta a Fontassenzio. Proprio presso il campo sportivo, ma in maniera più copiosa nel sentiero D, dove il basso grado di copertura arborea e i prevalenti affioramenti rocciosi hanno creato l'habitat ideale, si ritrovano le popolazioni di *Cistus laurifolius* da cui abbiamo campionato.

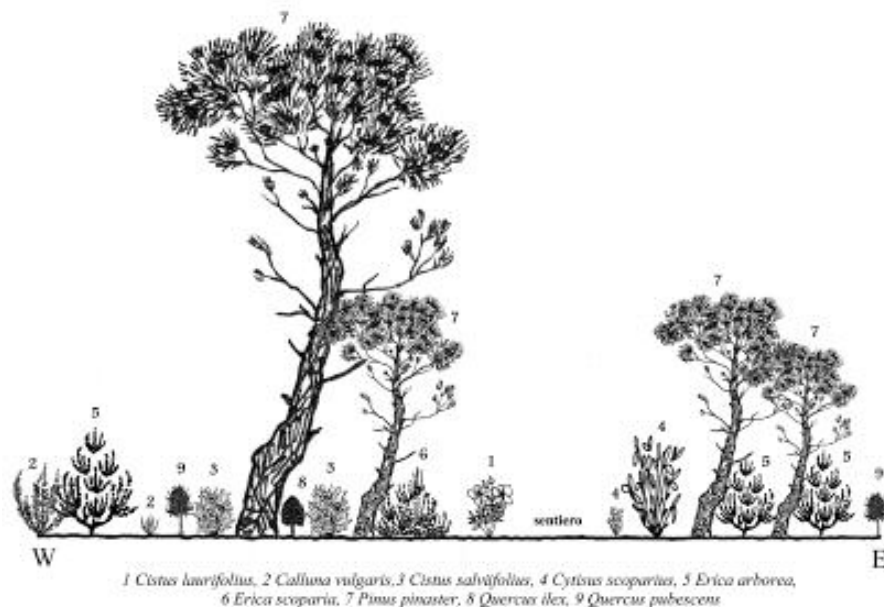


Figura 11. Profilo della vegetazione con bosco pineta rada di pino marittimo nei pressi del cimitero di S. Brigida

La pubblicazione sui tipi forestali della Regione Toscana definisce la Cerreta acidofila come "bosco frammentario di cerro misto, anche se dominante, con presenza nel piano arboreo di specie mesofile e mesoigrofile come *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner, *Fraxinus oxycarpa* Bieb. ex Willd., *Populus alba* L., *Populus nigra* L., *Carpinus betulus* L. e talvolta anche *Quercus robur* L., *Quercus ilex* L. e *Quercus suber* L., con sclerofille assai rare nel sottobosco, di aree a clima mediterraneo, ma su suoli alluvionali freschi".

Con riferimento al nostro territorio di campionamento, qui si ritrovano cedui di cerro con sottobosco arbustivo a *Erica scoparia* L. e *Erica arborea* L., *Cytisus scoparius* (L.) Link e *Cistus salviifolius* L., oltre a consociazioni di *Prunus spinosa* L. e *Crataegus* sp. pl. con *Quercus pubescens* Willd., *Ostrya carpinifolia* Scop., *Fraxinus ornus* L. e talvolta *Prunus avium* L..



Figura 12. Profilo della vegetazione con bosco misto di querce caducifoglie e arbusteto ad eriche e ginestra (transetto eseguito nella zona fra Fornellaccio e Fontassenzio).

- Ginestreto di *Cytisus scoparius*

Questa tipologia forestale ricopre 2,4 ha dell'area protetta, distribuiti lungo la strada tra Belvedere e Fontassenzio. Un primo popolamento, formato da *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Prunus spinosa* L. e *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, si ritrova all'interno del castagneto sulla pendice a monte della strada. Il secondo

occupa 2 ha sul margine della strada di Fontassenzio ed è caratterizzato da *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Erica scoparia* L., *Erica arborea* L., *Cistus salviifolius* L., *Cistus laurifolius* L., *Prunus spinosa* L., *Rubus* sp. pl., *Quercus cerris* L., *Ostrya carpinifolia* Scop. e *Populus* sp. pl.. Nel momento in cui la componente arbustiva lascia spazio allo sviluppo della macchia alto-arborea, il cisto non riesce più ad essere presente in quanto vengono a mancare le condizioni di illuminazione necessarie alla sua sopravvivenza.

- Macchie basse a eriche

Si sviluppano su un totale di 23 ha, tra 500 e 700 m da Fontassenzio alla parte alta del Fosso di Linari. La tipologia vegetazionale è caratterizzata da macchia media acidofila, alta 2,5-3 m, densa e dominata da *Erica arborea* L. e *Erica scoparia* L. con *Cytisus scoparius* (L.) Link, si possono ritrovare anche *Rosa canina* L., *Prunus spinosa* L., *Spartium junceum* L., *Crataegus* sp. pl., ma anche *Quercus pubescens* Willd., *Quercus cerris* L. e *Fraxinus ornus* L.; nelle zone rocciose più affioranti abbiamo *Cistus salviifolius* L., *Teucrium scorodonia* L., *Cistus laurifolius* L., *Teucrium chamaedrys* L., *Sedum rupestre* L., *Thymus serpyllum* L., *Thymus longicaulis* C. Presl, *Briza media* L., *Melica ciliata* L., *Helychrisum italicum* (Roth) G. Don fil., *Anthyllis vulneraria* Schiw. ex DC. e *Micromeria graeca* (L.) Benth.

Questo costituisce l'ambiente più adatto al cisto laurino che trova le sue condizioni di vita ideali negli affioramenti e nelle tasche rocciose, rimanendo nelle zone di margine là dove tendono a predominare le specie arboree con elevata copertura.

- Macchie basse a *Cistus*

Questa tipologia è caratterizzata da arbusteti bassi con copertura discontinua situati presso il santuario della Madonna del Sasso, lungo il sentiero 1 e la strada di Fontassenzio.

Le prime due località sono caratterizzate da *Cistus salviifolius* L., *Teucrium chamaedrys* L., *Thymus serpyllum* L., *Erica scoparia* L., *Erica arborea* L., *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Prunus spinosa* L. e *Rosa canina* L., *Quercus pubescens* Willd. e *Fraxinus ornus* L..

La strada di Fontassenzio ha invece prevalenza di *Cistus laurifolius* L. accompagnato da *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Spartium junceum* L., *Prunus spinosa* L. e *Rosa canina* L.. Qui ritroviamo le più importanti popolazioni di cisto il quale non risente della competizione con le specie arboree.

Nel corso della ricerca, in tempi diversi, sono stati fatti 3 campionamenti successivi in 4 siti differenti, all'interno dell'AMPIL, di distribuzione della specie per un totale di 208 esemplari. Per ciascun individuo sono stati campionati due esemplari, uno da essiccare per l'analisi morfologica, l'altro posto a -80°C per le analisi molecolari, tutti debitamente georeferenziati.

Nel corso dell'ultimo campionamento effettuato sono stati raccolti anche i campioni per le analisi fitochimiche. Per quanto riguarda il materiale per l'analisi della componente non volatile il materiale è stato raccolto e posto ad essiccare, mentre invece il materiale da sottoporre a gascromatografia è stato raccolto e subito analizzato da fresco.

LOCALITÀ	COORDINATE (LIMITI SUPERIORE ED INFERIORE)	N ESEMPLARI. CAMPIONATI	N SOTTOPOPOLAZIONI
strada per Fontassenzio (parte alta)	45°51'45,1 N - 11°23'45,0 E 45°51'42,2 N - 11°23'47,9 E	69	6
strada per Fontassenzio (parte media)	43°51'40,1 N - 11°23'36,9 E 43°51'39,2 N - 11°23'36,7 E	33	3
strada per Fontassenzio (parte bassa)	43°51'38,0 N - 11°23'44,1 E 43°51'36,8 N - 11°23'43,2 E	45	4
sentiero CAI n° 5	43°51'47,8 N - 11°23'28,6 E 43°51'44,5 N - 11°23'30,2 E	45	4
sentiero D	43°51'44,0 N - 11°24'13,5 E 43°51'42,7 N - 11°24'14,3 E	16	1
TOTALE ESEMPLARI CAMPIONATI		208	

Tabella 1. Coordinate, numero di esemplari e sottopopolazioni campionate a Santa Brigida.

Per quanto riguarda l'areale di distribuzione spagnolo sono stati campionati 10 individui in 3 differenti popolazioni, grazie all'ausilio del Prof. Pablo Manzano Baena (Dipartimento di Ecologia, Università Autonoma di Madrid), in doppio per l'analisi morfologiche e molecolari.

La prima popolazione, corrispondente a Spagna1, è stata campionata a nord di Madrid, la seconda, Spagna2, circa 200km a sud-ovest di Madrid, nella provincia di Caceres e infine la terza popolazione, Spagna3 è la più meridionale raccolta nei pressi di Granada, comune di Huétor.

In tabella 1 sono state riportate le coordinate del primo esemplare campionato, i successivi nove sono stati sempre campionati in quell'area ad una distanza di 10 m l'uno dall'altro.

LOCALITÀ	COORDINATE	N ESEMPLARI. CAMPIONATI
Spagna 1	40°44'52.25" N - 3°54'52,6" O	10
Spagna 2	39°29'31.79" N - 5°20'11.34" O	10
Spagna 3	37°15'10.71" N - 3°31'40.02" O	10
TOTALE ESEMPLARI CAMPIONATI		30

Tabella 2. Coordinate e numero di esemplari delle tre differenti popolazioni spagnole.

6.2 Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica è stata eseguita sul totale delle 4 popolazioni (quella di Santa Brigida e le tre Spagnole), per un totale di 238 individui. Nella popolazione italiana sono state individuate 5 subpopolazioni dalle quali è stato campionato un certo numero di individui, come indicato in tabella 1; per ogni individuo sono state prelevate 4-8 foglie. Ogni foglia è stata essiccata sotto pressa per poi essere scansionata ad una risoluzione di 300 dpi con uno scanner Epson Stylus DX 4450.

Le immagini archiviate sono state analizzate mediante il software WINMAC FOLIA in modo da acquisire i valori dei seguenti 13 parametri macromorfologici:

1. Area fogliare,
2. Perimetro della foglia,
3. Lunghezza della foglia,
4. Larghezza massima della foglia,
5. LAR/LUN: rapporto tra la larghezza e la lunghezza massima,
6. Lunghezza della lamina,
7. MPW: massima larghezza della lamina misurata in direzione perpendicolare alla lunghezza,
8. PMPW: posizione in percentuale alla lunghezza laminare,
9. PW1: larghezza misurata perpendicolarmente alla lunghezza nella posizione corrispondente a metà della lunghezza (50%) della lamina,
10. PW2: larghezza misurata perpendicolarmente alla lunghezza nella posizione corrispondente al 90% della lunghezza totale della lamina,

11. LB1: angolo del lobo misurato nella posizione corrispondente al 10% della lunghezza totale della lamina,
12. LB2: angolo del lobo misurato nella posizione corrispondente al 25% della lunghezza totale della lamina,
13. Lunghezza del picciolo.

In una prima fase i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva (media, varianza, coefficiente di variazione, normalità della distribuzione). Successivamente è stata effettuata un'analisi delle componenti principali (PCA), con il software Statistica versione 7.0, in modo da estrarre un certo numero di fattori, dal totale delle variabili analizzate e ridurre così i possibili problemi di ridondanza.

Su ciascuna componente estratta dalla matrice dei dati è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie secondo il modello lineare generale (GLM) considerando la popolazione come fattore fisso e la pianta come fattore random. Nei casi in cui è emerso un valore significativo di F per il fattore popolazione è stato condotto un confronto *post-hoc* mediante il test HSD di Tuckey al fine di individuare le differenze tra popolazioni.

Successivamente è stata condotta un'analisi discriminante stepwise per verificare la correttezza delle assunzioni fatte a priori e quindi determinare le variabili quantitative maggiormente significative per una corretta classificazione delle osservazioni. Le differenze sono state testate con un approccio *forward* prendendo in considerazione un F di entrata nel modello pari a 3,84 e di rimozione uguale a 2,71. Un test di cross-validazione (metodo "leaving-one-out") ha permesso di verificare l'efficacia delle variabili selezionate nel classificare gli individui di ciascuna popolazione campionata. La cross-validazione evita l'insorgere di errori di attribuzione che inficiano sul potere discriminatorio del modello. Essa consiste nel classificare ogni osservazione di un collettivo di n unità in base al criterio discriminante tratto dalle altre n-1 osservazioni, la funzione discriminante deve essere ricalcolata tante volte quante sono le osservazioni. Nella matrice di classificazione derivata la frequenza degli individui correttamente riassegnati può essere considerata come misura dell'integrità di quel gruppo.

6.3 Sviluppo e analisi dei marcatori molecolari nucleari

Sono stati messi a punto e testati sulla popolazione italiana e spagnola sei marcatori microsatelliti validi per la specie. Il lavoro poi è proseguito con l'analisi della trasferibilità dei nuSSR validi ad altre specie dello stesso genere presenti in Toscana: *Cistus salviifolius*, *Cistus ladanifer*, *Cistus albidus*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus x purpureus*. Di seguito è riportata la procedura.

Estrazione DNA

L'estrazione del DNA genomico dai campioni di *Cistus laurifolius* è stata eseguita con il DNeasy Plant Mini kit (Quiagen). Circa 0,6 g di foglie, precedentemente conservate a -20 °C sono state frantumate in mortaio con azoto liquido e quindi inserite all'interno di ogni tubo della piastra fornita dal kit per l'estrazione, quindi è stato eseguito il protocollo di estrazione secondo le indicazioni del produttore.

La buona riuscita dell'estrazione è stata controllata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all' 1%.



Figura 13. Protocollo di estrazione del DNA con il kit DNeasy Plant Mini kit (Quiagen).

Costruzione di una libreria genomica

Il DNA totale estratto è stato nebulizzato con nebulizzatore Nebulizer Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) con azoto gassoso ad una pressione di 25 psi per 30 sec al fine di ottenere una miscela di frammenti di 500-100 bp. La miscela di nebulizzazione è formata da DNA, Shearing Buffer (Glicerolo

70%, Tris 1M pH=8, EDTA 0,5 M pH=8) e H₂O filtrata e distillata in un volume finale di 800 µl.

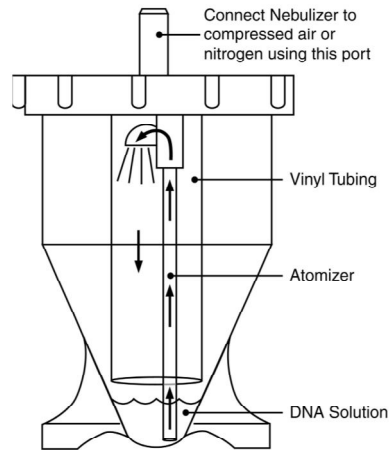


Figura 14. Nebulizer Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

I frammenti di DNA così ottenuti sono stati sottoposti a riparazione delle estremità tramite utilizzo del kit End-It DNA End-Repair Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA) e quindi ligati ad un vettore plasmidico pZEro-2 (Zero Background Cloning Kit, Invitrogen) e trasformati in cellule competenti di *E. coli*.

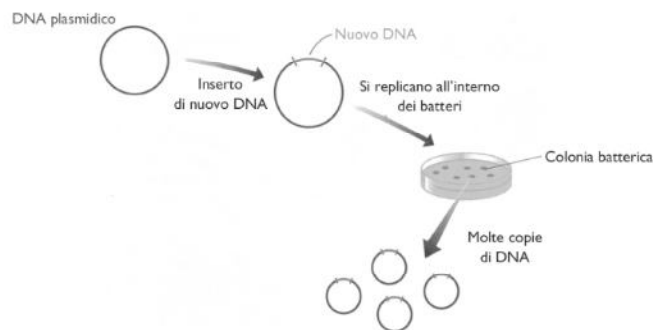


Figura 15. Ligazione dei frammenti di DNA ad un vettore plasmidico pZEro-2 (Zero Background Cloning Kit, Invitrogen) e trasformazione in cellule competenti di *E. coli*.

Sono stati quindi sequenziati 1500 cloni prelevati casualmente dalla libreria in direzione forward, grazie all'utilizzo del primer universal M13 con il kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems,

Foster City, California, USA) e fatti correre con il sequenziatore automatico ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Nelle sequenze sono state ricercate le ripetizioni di-, tri- o tetranucleotidiche con il software SPUTNIK.

Amplificazione

Le amplificazioni di *Cistus laurifolius* sono state condotte sia attraverso amplificazione dei singoli loci che in multiplex PCR, ossia amplificando più loci nella stessa reazione di PCR, inserendo in quest'ultimo caso primers con fluorofori differenti per non confondere i vari picchi nel momento dell'analisi dei dati.

L'amplificazione ha utilizzato la seguente miscela di reazione con GoTaq PCR Mix by PROMEGA (14 μ L di volume finale):

	Concentrazione		μ L/campione
DNA	10	ng/ μ L	2
Reagenti :			
Buffer	5	X	2.8
Primer Fw	10	μ M	0.098
Primer Rv	10	μ M	0.28
M13	10	μ M	0.28
Dntp	10	mM	0.28
Taq	5	U/ μ L	0.14
dH ₂ O			8.122
Totale	14	μ l	

Tabella 3. Mix per la reazione di amplificazione

La reazione di amplificazione è stata fatta in un sistema GeneAmp PCR system 9700 (PE Biosystems) con il seguente profilo: 5' di denaturazione a 94°C seguiti da 10 cicli con temperatura di annealing touch down (30'' a 94°C, 40'' da 60 a 50°C diminuendo 1°C per ciclo) e infine 40'' di estensione a 72°C con un passaggio finale a 72°C per 8'.

Un'aliquota dell'amplificato è stata fatta correre su gel d'agarosio all'1% (GE Healthcare) per confermare la buona riuscita dell'amplificazione e l'intensità del prodotto di PCR.

Quindi i prodotti di reazione fluorescenti sono stati fatti correre in un sequenziatore ABI 3130xl DNA Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Purificazione e sequenziamento

Il sequenziamento degli amplificati, processo necessario per identificare l'ordine delle basi azotate, è un processo del tutto automatizzato che si basa sul metodo di Sanger

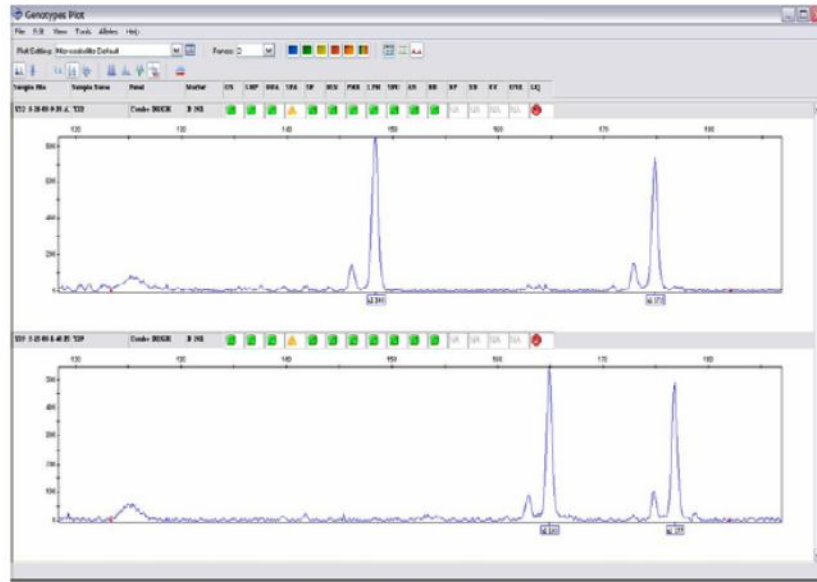


Figura 16. Elettroferogramma dal software GENMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

Il sequenziamento è preceduto da:

-marcatura: il prodotto della reazione di amplificazione è stato marcato mediante l'utilizzo del kit di sequenza BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) secondo il protocollo fornito dal produttore modificando la reazione di marcatura in maniera opportuna così da minimizzare i costi dei materiali.

	Concentrazione		µL/campione
Prodotto PCR	10	ng/µL	2
Reagenti :			
BigDye Sequencing Buffer	5	X	2
Primer Fw	10	µM	1,6
Primer Rv	10	µM	1,6
dH ₂ O			3,4
Totale	10	µl	

Tabella 4. Mix per la reazione di marcatura

Le marcature sono state fatte utilizzando il termociclatore GeneAmp® PCR System 9700, con il seguente protocollo: 1 minuto a 96°C (attivazione Taq polimerasi), 25 cicli composti da 10 secondi a 96°C (denaturazione), 5 secondi a 50°C (annealing), 4 minuti a 60°C (polimerizzazione frammenti), il tutto viene poi mantenuto a 4°C;

-purificazione: la purificazione è un passaggio che consente di eliminare i ddNTPs che non sono stati incorporati nella reazione di marcatura;

-denaturazione: i campioni prima di essere analizzati dal sequenziatore devono essere denaturati. I prodotti, purificati e risospesi in 15 µl di formammide, vengono caricati in una piastra da 96 pozzetti (Applied Biosystem). A questo punto la piastra viene posizionata nel termociclatore a 95°C per 5 minuti per effettuare la denaturazione dei campioni. Al termine dell'incubazione, per evitare la rinaturazione, la piastra viene tenuta in ghiaccio per ulteriori 5 minuti, poi finalmente sequenziata.

Le sequenze dei frammenti di PCR amplificati, purificati e denaturati sono state ottenute con il sequenziatore ABI 3130xl (Applied Biosystems) con 16 capillari.

L'intensità della fluorescenza nell'informazione elettronica è stata trasferita al computer e raccolta dal software GENMAPPER 4.0 (Applied Biosystems). Il software è responsabile della costruzione dell'elettroferogramma, dove viene riportata la sequenza delle basi ottenute in base alla lettura dei picchi di emissione dei fluorocromi.

Il protocollo per il sequenziamento prevede la preparazione di una soluzione composta da:

- 1 µl di DNA amplificato;
- 12 µl di formammide (Applied Biosystems) che denatura il DNA;
- 0,2 µl di size standard (SIZE STANDARD 500(-250) LIZ Applied Biosystems) che fornisce la scala di taratura per l'analisi dei frammenti.

Analisi di sequenza

Le sequenze sono state controllate, assemblate, analizzate e allineate con il software CodonCode Aligner.

Le informazioni genetiche così ottenute sono state organizzate in un dataset e quindi analizzate su base statistica con l'applicazione GeneAIEx v.6 per Microsoft Excel (Pealkall e Smouse, 2006). Tramite GeneAIEx è stato calcolato:

- numero medio osservato (N_a) e il numero effettivo (N_e) di alleli per locus, calcolato come $N_e = 1/\sum p_i^2$, dove p_i rappresenta la frequenza dei possibili alleli ad un determinato locus (Kimura e Crow, 1964);
- percentuale di loci polimorfici (P%);
- eterozigosità osservata (H_o), l'eterozigosità attesa (H_E) calcolata come $H_E = 1 - \sum p_i^2$ dove p_i è la frequenza di tutti gli alleli nella specifica popolazione, se all'interno della stessa gli incroci sono casuali H_E sarà pari a $2pq$;
- equilibrio di Hardy-Weinberg.

6.4 Analisi dei marcatori plastidiali

Sono stati provati i marcatori microsatellite cloroplastici ccmp1-ccmp10 (Weising e Gardner, 1999) e quelli sviluppati per le Fagaceae cmcs 1-14 (Sebastiani *et al.*, 2004) su un campione di individui della popolazione italiana e spagnola.

L'analisi dei marcatori polimorfici è stata quindi estesa a tutti gli individui provenienti dalla popolazione toscana e su 16 delle tre differenti popolazioni spagnole.

Le condizioni di amplificazione sono state: 25 μ l finali di volume di reazione contenenti:

		Concentrazione		μ L/campione
DNA		10	ng/ μ L	1
Reagenti :				
	Buffer	5	X	5
	MgCl ₂	25	mM	1
	BSA	10	mg/ml	0,25
	Primer Fw	10	μ M	0,5

	Primer Rv	10	μM	0,5
	dNTP	10	mM	0,5
	Taq	5	U/μL	0,25
	dH ₂ O			16
Totale		25	μl	

Tabella 5. Mix per la reazione di amplificazione dei microsatelliti plastidiali.

L'amplificazione è stata effettuata applicando il seguente profilo: denaturazione a 94 °C per 5 minuti, trenta cicli composti da denaturazione a 94 °C (30 secondi), appaiamento a 55 °C (30 secondi) ed estensione a 72 °C (1 minuto), estensione finale a 72 °C (7 minuti).

Codice	Posizione	Motivi ripetuti	Sequenza del primer	Ta (°C)	Dimensione in tabacco (bp)
ccmp1	<i>trnK</i> intron	(T)10	5'-CAGGTAACTTCTCAACGGA-3'	58	139
			5'-CCGAAGTCAAAAGAGCGATT-3'	58	
ccmp2	5' to <i>trnS</i>	(A)11	5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3'	60	189
			5'-ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	60	
ccmp3	<i>trnG</i> intron	(T)11	5'-CAGACCAAAAGCTGACATAG-3'	58	112
			5'-GTTTCATTCGGCTCCTTTAT-3'	56	
ccmp4	<i>atpF</i> intron	(T)13	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3'	60	126
			5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'	58	
ccmp5	3' to <i>rps2</i>	(C)7(T)10	5'-TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT-3'	62	121
		(T)5C(A)11	5'-AGGTTCCATCGGAACAATTAT-3'	58	
ccmp6	ORF 77-ORF 82 intergenic	(T)5C(T)17	5'-CGATGCATATGTAGAAAGCC-3'	58	103
			5'-CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	60	
ccmp7	<i>atpB-rbcL</i> intergenic	(A)13	5'-CAACATATACCACTGTCAAG-3'	56	133
			5'-ACATCATTATTGTATACTTTTC-3'	58	
ccmp8	<i>rpl20-rpl12</i> intergenic	(T)6C(T)14	5'-TTGGCTACTTAACCTTCCC-3'	60	77
			5'-TTCTTTCTTATTTTCGAGDGAA-3'	58	
ccmp9	ORF 74b- <i>psbB</i> intergenic	(T)11	5'-GGATTTGTACATATAGGACA-3'	54	98
			5'-CTCAACTCTAAGAAATACTTG-3'	56	
ccmp10	<i>rpl2-rps19</i> intergenic	(T)14	5'-TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA-3'	56	103
			5'-TTCGTCGDCGTAGTAAATAG-3'	58	

Tabella 6. Marcatori microsatelliti plastidiali ccmp1-10 (Weising e Gardner, 1999) saggiati sul cisto.

Locus	Location	Repeat motifs	Primer sequences (5'-3') sense antisense	T_a (°C)	PCR product size (bp)*	Variants in <i>C. sativa</i>	Variants in <i>F. sylvatica</i>	Variants in <i>Q. petraea</i>	GenBank Accession no.
Cmcs1	petD intergenic	(AT) ₇	ATTCATTTCCTTTGCAATGA TTTACTTGTACTAATAGGGTCTAGC	55	109	1	1	1	AY497340
Cmcs2	psbC-trnS intergenic	(AT) ₉	GAGCCATTCOCTTTTAGAAT TTGAAAACCGGTATAGTTCCG	55	151	2	1	1	AY497341
Cmcs3	petA-psbJ intergenic	(AT) ₇	AGAGTAAGGTTTTATTAGTATAGA CTCGATAGTATTCTCGAT	52	189	2	2	1	AY497342
Cmcs4	ycf10 gene	(TC) ₅	ATTCAATCCOCTTCTATATC CCTAGTATCCCACCAATTA	55	110	2	1	1	AY497343
Cmcs5	ndhG-ndhI intergenic	(T) ₉	TTTATCTTAAAGGGTAGTTTTAGAC CGGTTCCTTTTCGTATTTTT	55	151	2	1	2	AY497344
Cmcs6	ndhG-ndhI intergenic	(T) ₁₀	GAAAAAGGACCCCTTCCDAAT CTTATGATCGTCAOGAATTG	55	199	2	1	2	AY497345
Cmcs7	ndhH-rps15 intergenic	(T) ₁₂	AAGCGAGATGAATGAGTTTT AAAAATGGATTCATATATGACT	54	205	3	1	1	AY497351
Cmcs8	ndhH-rps15 intergenic	(A) ₁₀	GGTCTATTTTTCCACTCACAA AGAAATAAACACCCCAATTA	55	179	1	1	1	AY497352
Cmcs9	ycf5-ndhD intergenic	(T) ₉	AAAAATACTCTTTTTTCGTTTTTC CCTGAATAAAATTCAAATCAA	55	101	1	1	1	AY497346
Cmcs10	ndhD gene	(A) ₉	TCTTGCTCTTTGATTTTGAA GACCGGAGAGTTATTTTAT	55	170	2	2	1	AY497347
Cmcs11	ndhD gene	(A) ₉	AATAAGAGTTTGGGGCATTA GTATCTTATCGATGGCTCC	55	225	1	1	1	AY497348
Cmcs12	ndhD-psaC intergenic	(A) ₉	ATATTGGTAAAACGGCAACT TTTATGGCATGAACCAACTC	55	226	1	2	1	AY497349
Cmcs13	rrn5-trnR intergenic	(T) ₁₄	CACATCTTCTTAACCCGAAA CCAOGTCTCTAATCCTCT	55	126	1	1	1	AY497353
Cmcs14	accD-psaI intergenic	(AT) ₇	GGATTGTAACAAATTTTTCAGG GTGCAAGGAATGTGAACTA	55	178	2	1	1	AY497350

T_a : annealing temperature; PCR, polymerase chain reaction.
*In *C. sativa*.

Tabella 7. Marcatori microsatellite plastidiali delle Fagaceae cmcs 1-14 (Sebastiani *et al.*, 2004) saggiati sul cisto.

I loci microsatellite amplificati sono stati separati in accordo alle loro dimensioni con il sequenziatore a capillari Applied Biosystems 3130xl e i risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica con l'applicazione GeneAIEx v.6 per Microsoft Excel (Pealkall e Smouse, 2006) ed è stato calcolato:

-il numero di aplotipi: $N_e = 1 / \sum p_i^2$,

-la diversità aplotipica: $H_E = [n / (n-1)] [1 - \sum p_i^2]$, dove n è il numero di individui analizzato per ogni popolazione e p_i è la frequenza dell'aplotipo i-esimo all'interno della popolazione (Nei, 1987).

-la differenziazione genetica all'interno della popolazione attraverso l'analisi della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992).

6.5 Analisi fitochimica

Al fine di poter utilizzare, per le analisi successive, un prodotto che contenga in soluzione tutti i metaboliti contenuti nella droga e ne mantenga

inalterate le proprietà, abbiamo messo a punto tre differenti metodiche di estrazione, conducendo l'analisi fitochimica dei tre estratti prodotti.

-ESTRATTO con NAVIGLIO ESTRATTORE da materiale ESSICCATO (ENES): la preparazione di estratti mediante l'utilizzo di Naviglio Estrattore risulta essere una metodica innovativa, affidabile e vantaggiosa per l'estrazione dei principi attivi delle piante utilizzate a scopo alimentare e salutistico. Già da alcuni anni, presso l'U.O. di Biologia Farmaceutica dell'Università degli Studi di Siena, in collaborazione con la ditta produttrice dello strumento (ATLAS FILTRI di Padova) e con il laboratorio di ricerca della Società Italiana di Fitoterapia, si sta portando avanti un lavoro di ricerca sperimentale volto ad standardizzare e validare quali-quantitativamente tale metodica.

L'apparecchio utilizzato per l'estrazione da foglie di *Cistus laurifolius* essiccate è un Naviglio Estrattore da 500cc della ATLAS Filtri.



Figura 17. Naviglio Estrattore

Questo strumento si basa sul "Principio di Naviglio" (Naviglio, 2003): l'estrazione avviene poiché si crea un gradiente negativo di pressione dall'interno all'esterno della matrice solida, il tutto condotto a temperatura

ambiente, garantito dal movimento di un pistone all'interno della camera d'estrazione. Un ciclo estrattivo è costituito da una fase statica e da una fase dinamica; durante la fase statica il solvente è posto sotto pressione a 8-10 atm a contatto con la droga un tempo sufficiente per penetrare al suo interno. Successivamente viene ripristinata la pressione atmosferica e il solvente fuoriesce rapidamente dalla droga trasportando con sé il materiale estratto. Il ciclo viene ripetuto, con ricircolo dello stesso solvente, finché la droga non è esausta.

La durata dell'estrazione dipende dal numero dei cicli, dalla durata della fase statica e dal numero dei colpi di pistone nella fase dinamica.

Sono stati valutati i seguenti parametri per ottimizzare e adattare alla specie studiata la tecnica estrattiva:

- Fase dinamica (FD)
- Fase statica (FS)
- Numero cicli (NC)
- Gradazione alcolica (da 25° a 90°)

L'acqua utilizzata in tutte le analisi è stata prodotta con apparecchio Millipore Milli-DI™ e riprocessata attraverso lo strumento Millipore Simplicity 185 per la produzione di acqua ultrapura. L'etanolo al 96% V/V è stato acquistato da Sigma-Aldrich.

Per l'estrazione mediante Estrattore Naviglio® il campione è stato pesato e trasferito in un sacchetto con dimensione dei pori di 50 µm fino a riempimento completo. Il sacchetto è stato posto all'interno della camera di estrazione successivamente riempita con il solvente estraente e chiusa ermeticamente. L'estratto ottenuto è stato opportunamente portato ad un rapporto droga:estratto 1:10 p/p mediante aggiunta dello stesso solvente utilizzato per l'estrazione. Sull'estrattore sono stati impostati i parametri seguenti: fase statica: 6 min.; fase dinamica: 18 colpi pistone/ciclo; numero cicli: 30.

Siamo partiti con un peso (droga + sacchetto necessario per contenerla) di 93,90g per ottenere un estratto di 341,8g, con un rapporto estratto/droga di 5,74g. Questo sta ad indicare che sono presenti 174,21g di droga in 1Kg di estratto.

-ESTRATTO con MACERAZIONE TRADIZIONALE (F.U. XII) da materiale FRESCO (EMTF): la macerazione è stata effettuata su foglie di *Cistus laurifolius* appena raccolte. La macerazione tradizionale consiste nel lasciare la droga a contatto con un solvente in rapporto 1:10, a temperatura ambiente, per un periodo di tempo di 10-30 giorni. 10 g di droga, adeguatamente triturrata, è stata posta in un beker con 100 ml di etanolo al 65%; quindi è stata fatta riposare per 3 settimane per poi essere decantata e filtrata spremendo il residuo.

-ESTRATTO con MACERAZIONE TRADIZIONALE da materiale ESSICCATO (EMTS): la macerazione è stata effettuata su foglie di *Cistus laurifolius* essiccate in stufa a 105 °C per il tempo necessario per mantenere costante il suo peso. Sono stati pesati 10 g di foglie e lasciate in stufa a 100°C per 24 ore ottenendo un peso di 4,92 g; sono state quindi lasciate in stufa per altre 24 ore al fine di assicurarsi una stabilità di peso (4,84 g finali). Questo dato ci è servito anche per fornire l'indicazione sulla perdita all'essiccamento.

Le foglie sono state poste a macerare con etanolo al 65% V/V in rapporto 1:10 (4,84 g di droga in 48,4 mL di solvente) per tre settimane, quindi è stato decantato e filtrato l'estratto.

Gli estratti sono stati sottoposti a screening fitochimico preliminare, saggi di tipo chimico-fisico che inducono alla formazione di precipitati o colorazioni caratteristiche predittive della possibile presenza di alcune classi di composti. I risultati ottenuti sono solo qualitativi e devono essere sottoposti a conferma con test specifici per ogni classe di composto in quanto soggetti a falsi negativi per la scarsa sensibilità del metodo (Morelli *et al.*, 2005). Malgrado ciò risultano necessari in una prima fase di lavoro allorquando non si abbia una caratterizzazione completa della specie oggetto di studio.

Successivamente tutti gli estratti prodotti sono stati sottoposti a indagini analitiche mediante tecniche spettrofotometriche utilizzando uno spettrofotometro SAFAS UVMC2.

Un'aliquota di ogni estratto è stata disciolta nel solvente di estrazione e portata alla concentrazione di 1 mg/mL. Tramite spettrofotometria UV-visibile tra 210 nm e 800 nm sono stati ottenuti gli spettri dei campioni in soluzione.

Si è successivamente proceduto all'analisi qualitativa delle classi di costituenti principali degli estratti mediante semplici test di riconoscimento.

La determinazione dei flavonoidi totali è stata condotta modificando opportunamente la metodica di Sosa *et al.* (2007), utilizzata per il calcolo dei flavonoidi totali nella propoli. I campioni, diluiti 100 volte, sono stati analizzati direttamente per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda del loro massimo caratteristico della frazione flavonoidica, a 359 nm. La taratura è stata fatta con campferolo standard (massimi a 274 e 359 nm) a concentrazioni comprese tra 100 e 6400 µg/mL.

Le proantocianidine (flavan-3-oli totali) sono state determinate con il saggio della vanillina. L'anello A catechinico in ambiente acido reagisce con aldeide vanillica per formare un addotto rosso con un massimo di assorbimento a 500 nm. Con questa semplice reazione colorimetrica è stata determinata la presenza di catechine e proantocianidine nei singoli campioni.

Gli estratti sono stati sciolti in etanolo (1 mg/mL) ed un'aliquota è stata prelevata e addizionata a 1 mL di acido cloridrico 11.5 N e 0,5 mL di soluzione di vanillina in etanolo (1%). Il saggio è positivo per comparsa immediata di colore rosso. Il controllo positivo è stato eseguito con catechina pura (Monagas *et al.*, 2003).

Anche per la verifica della presenza di flavonoidi e composti correlati si è ricorsi ad una reazione cromatica semplice ed efficace, la reazione di Willstätter: agli estratti sciolti in etanolo è stato aggiunto un truciolo di magnesio metallico e acido cloridrico concentrato. La comparsa di una intensa colorazione gialla o arancio o rossa indica la presenza di flavonoidi. Il controllo positivo è stato ottenuto con estratti secchi di *Hypericum perforatum*. (Morelli, 1981).

Per testare la presenza di alcaloidi sono stati eseguiti i saggi con reattivo di Dragendorff, di Mayer e di Hager.

Gli estratti sono stati sciolti in etanolo (1 mg/mL) e ad 1 mL di soluzione si è aggiunto il reattivo di Dragendorff composto da ioduro di potassio e bismuto. Il saggio è positivo con comparsa di precipitato arancio-rosso.

Sulle stesse soluzioni è stato condotto anche il test con l'acido picrico che precipita in giallo gli alcaloidi (reattivo di Hager).

Per un confronto con dei controlli positivi sono stati eseguiti gli stessi saggi su campioni di boldina pura (Morelli, 1981).

Per le cumarine invece soluzioni etanoliche degli estratti (1 mg/mL) sono state inserite in un tubo da saggio chiuso con carta impregnata di idrossido di sodio 0,25 mol/L; alla luce ultravioletta la carta assume colorazione verde in tutta l'area a contatto con l'apertura del tubo in presenza di cumarine. Il controllo positivo è stato fatto con cumarina pura (Morelli, 1981).

Per verificare la presenza di glicosidi triterpenici e steroidei il saggio effettuato è stato quello di Liebermann – Burchard.

Gli estratti sono stati sciolti in una miscela di acqua:acetone 1:1 (1mg/mL); su 1 mL di tali soluzioni è stata versata goccia a goccia una miscela 19:1 di anidride acetica – acido solforico (reattivo di Liebermann – Burchard). Una colorazione blu intensa indica la presenza di glicosidi steroidei mentre una colorazione viola, rossa o porpora indica la presenza di glicosidi triterpenici (Morelli, 1981).

I polifenoli invece sono stati analizzati con il metodo Folin-Ciocalteu.

I polifenoli sono costituiti da una struttura aromatica con gruppi funzionali ossidrilici. Tale struttura li rende sostanze ad attività antiossidante, in grado di quindi di catturare atomi di ossigeno libero (forma radicalica), reagire con esso e ridurne di conseguenza la capacità ossidante. Tale processo previene il danneggiamento delle cellule e dei tessuti negli organismi viventi.

La reazione tra fenoli e il reagente di Folin-Ciocalteu prevede l'ossidazione del gruppo fenolico (R-OH) con una miscela di acido fosfotungstenico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) alla forma chinoide (R=O) in ambiente alcalino. I prodotti di riduzione (ossidi metallici) sono responsabili della colorazione blu del campione e presentano un massimo di assorbimento a 765 nm, che è proporzionale al contenuto fenolico totale, espresso come g/l di equivalenti di acido gallico (GAE).

Il metodo scelto per la realizzazione dell'esperimento è quello proposto da Singleton (1965) opportunamente modificato: a 100 ml di campione sono stati aggiunti 7,9 ml di acqua distillata e 500 ml del reagente di Folin-Ciocalteu. Per innescare la reazione dopo 2 minuti vengono aggiunti 1,5 mL di soluzione Na_2CO_3 anidro al 20%, in modo da ottenere un volume totale finale di 10 mL. I campioni così ottenuti vengono incubati al buio a temperatura ambiente per 2 ore, dopodichè viene misurata l'assorbanza di ciascuno a 765 nm. I dati

quantitativi sono stati ricavati per interpolazione utilizzando una curva di taratura dell'acido gallico.

Per la determinazione preliminare della capacità antiossidante "chimica" dell'estratto idroalcolico di cisto è stato utilizzato il metodo spettrofotometrico con DPPH (2,2'-difetil-1-picrilidrazile).

Le sostanze antiossidanti svolgono un'attività sul DPPH attraverso due differenti meccanismi:

- diretto legato all'allontanamento di atomi di idrogeno,
- legato ad un trasferimento protonico.

Tale reazione porta ad una variazione del colore della soluzione, da un rosa intenso al giallo pallido e il risultato è un decremento dell'assorbanza a 515 nm. (Menghini *et al.*, 2010).

Metodiche *in vitro* diverse, una tra tutte l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), riscuotono oggi maggior successo e credito del metodo DPPH, ma l'esperienza del gruppo di ricerca dell'Università degli Studi di Siena, U.O. di Biologia farmaceutica, maturato in questi anni (Taliani, 2009) con il confronto sperimentale dei diversi saggi per l'attività antiradicalica degli estratti vegetali ci ha indotto a rivalutare questo semplice test.

La soluzione di DPPH è stata preparata solubilizzando il reattivo in metanolo alla concentrazione di 1×10^{-4} M.

I campioni sono stati solubilizzati in acqua:etanolo 1:1 e sono state preparate soluzioni con range di concentrazione iniziale compreso tra 8 mg/mL e 62,5 µg/mL.

In cuvette aventi percorso ottico di 1 cm, sono state poste le soluzioni dei campioni a diverse concentrazioni e la soluzione di DPPH (1:19) e si è lasciato incubare a temperatura ambiente, al buio per 30'. Il controllo positivo è stato realizzato con acqua e etanolo al 60% V/V e DPPH (1:19). L'inibizione percentuale del DPPH è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = (\text{Abs}_c - \text{Abs}_x) / \text{Abs}_c \times 100$$

dove Abs_c è l'assorbimento del controllo positivo e Abs_x l'assorbimento del campione. (Molyneux, 2004; Sharififaf *et al.*, 2007).

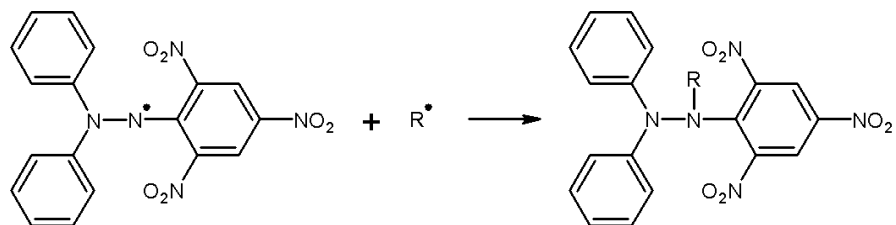


Figura 18. Reazione del DPPH con un composto antiossidante

Le ulteriori indagini analitiche sono state condotte con un HPLC Agilent LC 1200 *rapid resolution*, accoppiato ad un rivelatore a fotodiodi DAD e ad uno Spettrometro di Massa triplo quadrupolo 6410, con sorgente multimode (ESI + APCI) operante in modalità ioni positivi/negativi.

La colonna utilizzata per le analisi è stata una Colonna Varian Polaris C, RP 18 (15 cm x 2 mm, 3 μ m).

Per l'HPLC il volume di iniezione è stato di 20 μ l, il flusso è stato regolato a 0,25 mL/min, la densità ottica è stata misurata alle lunghezze d'onda di 280 e 360 nm.

Le condizioni di lavoro MS sono state:

- Scan m/z range: 100 – 900 m/z
- Elettromoltiplicatore: 500 V
- Temperatura Gas sorgente: 350°C
- Flusso di azoto: 8 L/min
- Pressione: 30 psi
- Fragmentor: 100 V

Tutti i solventi sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich, Milano.

Allo stesso tempo sono state effettuate analisi gascromatografiche al fine di analizzare componente metabolica volatile presente nelle foglie di *Cistus laurifolius*. Questo dato è stato relazionato e comparato con la componente volatile che caratterizza l'altra specie, dello stesso genere *Cistus*, presente a Santa Brigida *Cistus salviifolius*.

I campioni per le analisi GC/FID sono stati preparati immergendo le foglie fresche delle due specie in azoto liquido e macinandole con mortaio in ceramica porosa per circa 1 min. La macinazione permette la rottura delle strutture cellulari contenenti le sostanze terpeniche evitandone la perdita. Circa 0,5 g di foglie macinate per campione sono state sottoposte ad estrazione con 3

ml di n-pentano, con tridecano, utilizzato come standard interno. Il processo estrattivo è andato avanti per ventiquattro ore, con agitazione ad una velocità di 1000 giri al minuto e una temperatura di 24 °C.

L'estratto così ottenuto è stato filtrato mediante siringhe manuali con filtri a porosità di 0,45 μm e posto in minivials chiuse ermeticamente con setto di teflon e tappo in alluminio, conservate a -20 °C fino al momento delle analisi.

I campioni così ottenuti sono stati analizzati con gascromatografo Perkin-Elmer AutoSystem dotato di un campionatore per liquidi. La colonna utilizzata, Cyclodex-B capillary column (lunghezza 30 m, 0,25 mm diametro interno, J & W Scientific, CA, U.S.A.) è chirale e quindi in grado di identificare le differenti coppie enantiomeriche.

I terpeni sono stati identificati mediante confronto con i tempi di ritenzione di standard puri, utilizzando le stesse condizioni di analisi:

- gas di trasporto: 1,5 mL H₂ al minuto;
- flusso dello split: 10,00 mL al minuto;
- quantità iniettata: 1 μL ;
- temperatura di iniezione: 250 °C;
- tempo di equilibrio: 2 minuti;
- detector: 350 °C;
- parametri del forno (temperature, tempi, gradiente):
 - 40 °C per 5 minuti,
 - 1,5 °C/min fino a 200°C,
 - 40°C/min fino a 220°C,
 - 220°C per 10 minuti 0 minuti

6.6 Test *in vitro*

I test *in vitro* sono stati eseguiti su linfomonociti (PBMC) umani, isolati da sangue venoso, e su cellule tubulari renali.

Il sangue venoso, prelevato da volontari sani, è stato prelevato in provette con EDTA (1,3 mL/50 mL di sangue) per prevenire la coagulazione ed è stato immediatamente utilizzato.

Il sangue è stato centrifugato con Histopaque (Sigma-Aldrich) in proporzione di 5(sangue):3(Histopaque) per 15' a 2700 rpm, è stato recuperato l'anello linfomonocitario e portato a volume con fisiologica (40 mL), ricentrifugato per 10' a 2700 rpm e quindi di nuovo sospeso in fisiologica. Sono stati fatti due successivi lavaggi e centrifugato a 2300 rpm per 10' e poi risospeso in 1 mL di terreno. I PBMC sono contati attraverso microscopia su camera citometrica di Burkner. Le cellule sono risospese nel medium desiderato composto da: 98% di RPMI, 1% di Penicillina/Streptavidina, 1% di Glutamina 200 nM.

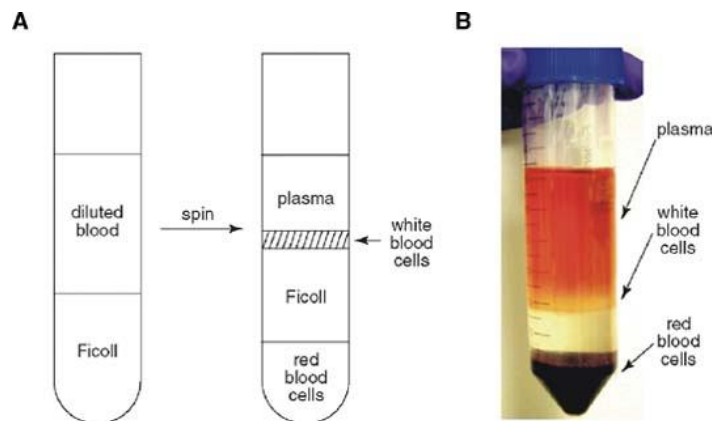


Figura 19. Separazione, tramite centrifugazioni, dei vari componenti del sangue.

In piastre multiwell da 24, in ogni pozzetto è introdotto il mezzo di coltura, RPMI e 10^6 PBMC.

Il primo saggio effettuato per valutare la citotossicità degli estratti di *Cistus laurifolius* è stato quello della vitalità cellulare calcolata come percentuale di linfomonociti vivi. I linfomonociti, isolati dal sangue umano con la metodica sopra descritta, sono stati lasciati incubare con concentrazioni dallo 0,01% all'1% di ENES e EMTF e quindi poi sospesi 20 μ l di cellule con 50 μ l di Trypan Blue e 30 μ l di terreno RPMI. Il colorante Trypan Blue colora selettivamente le cellule morte, dove riesce a penetrare, e quindi è possibile contare, al microscopio ottico tramite la Camera di Burkner, le cellule che sono morte dopo trattamento con l'estratto. E' stato eseguito un controllo dello stato cellulare pre-stimolazione mediante aggiunta del colorante.

Il numero medio di cellule per millilitro di soluzione è calcolato per mezzo della formula:

Cellule per mL = conteggio medio per quadrato x fattore di diluizione x 10^4 .

La vitalità delle cellule viene calcolata come:

% di vitalità = (numero di cellule vive / numero totale di cellule) x 100.

L'azione protettiva dei campioni dal danno ossidativo alle membrane cellulari è stata saggiata mediante il test dello ioduro di propidio su una linea di cellule umane tubulari renali in coltura stimolate con perossido di idrogeno. La metodica prende come riferimento la letteratura più recente che utilizza lo ioduro di propidio come sonda per l'indagine della lesione delle membrane. (Pugliese *et al.*, 2009).

A causa delle modificazioni della morfologia cellulare successive al danno ossidativo (perdita di fluidità di membrana e modifica del potenziale di membrana), lo ioduro di propidio penetra all'interno della cellula e si intercala a livello del DNA; in seguito a tale legame lo ioduro diventa eccitabile e capace di emettere in fluorescenza; per correlare più correttamente le letture dello strumento con l'effettiva morte cellulare, è stata in parallelo effettuata una conta delle cellule morte col metodo del Trypan Blue in una piccola aliquota cellulare.

La preparazione dei reagenti e lo svolgimento del test hanno seguito il protocollo seguente.

Si prepara una soluzione 500 μ M di ioduro di propidio sciogliendone 3,34 mg di in 10 mL di H₂O₂.

Per il test si utilizza H₂O₂ al 30% già pronta.

10⁵ cellule per pozzetto sono state seminate in una piastra a 24 pozzetti nel mezzo contenente DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) FBS (Fetal Bovine Serum) al 10% e 1% della soluzione antibiotica penicillina/streptomina; le cellule sono mantenute a 37 °C con CO₂ al 5%.

Il giorno seguente il terreno è stato aspirato, le cellule sono state lavate con fisiologica ed è stato aggiunto il mezzo privo di FCS. Successivamente, in triplo, si è aggiunto l'estratto di cisto ENES alla concentrazione di 250 μ g/mL e 500 μ g/mL.

Dopo 24 ore di incubazione, sono stati aggiunti 10 µL di ioduro di propidio 500µM precedentemente preparato, tale da avere una concentrazione nel pozzetto di 5µM e si è proceduto ad una prima lettura al citofluorimetro a piastre, dopodiché è stato aggiunto H₂O₂ 0,3 mM ad esclusione dei pozzetti controllo. È stata a questo punto eseguita una lettura al citofluorimetro sia subito dopo l'aggiunta di H₂O₂ che dopo un'ora.

Al termine della lettura il terreno è stato aspirato, è stato effettuato un lavaggio con fisiologica, si sono aggiunti il mezzo e il propidio ed è stata effettuata un'altra lettura. Le letture si sono succedute ogni ora per 8 ore e dopo 24 ore. Le letture sono proporzionali alla quantità di reagente che penetra nelle cellule. I valori sono stati espressi normalizzandoli sulla lettura al tempo 0 per cui laddove non vi siano alterazioni morfologiche il rapporto che ne deriva resta vicino all'unità mentre nel caso di danno ossidativo si osservano valori crescenti nel tempo. La correlazione delle letture in fluorescenza con l'effettiva morte cellulare è stata fatta conteggiando dopo 24 ore le cellule morte che in presenza di Trypan Blue assorbono il colorante. Al microscopio si è proceduto alla conta delle cellule morte sul totale delle cellule contate preparando la camera di Burker così come già descritto per la conta dei PBMC.

Il grado di protezione alle 24 ore è espresso relazionando i dati così ottenuti al controllo (protezione pari al 100%) e al gruppo trattato con solo perossido di idrogeno.

Per l'analisi delle proprietà antimicrobiche dell'estratto selezionato è stata valutata la sensibilità di alcuni batteri e funghi, tra quelli che più comunemente causano infezione nell'uomo a vari comparti anatomici, all'estratto di cisto alla concentrazione di 1:250 e 1:500.

I ceppi batterici sono stati acquistati dalla batterioteca dell'Università di Goteborg (CCUG) e per le analisi sono stati utilizzati i seguenti:

Ceppi usati	Origine
<i>Escherichia coli</i> 25404	ATCC
<i>Escherichia coli</i> O21	Isolato clinico
<i>Salmonella enterica</i> 11732	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	ATCC

<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATCC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14990	ATCC
<i>Candida albicans</i> 90028	ATCC
<i>Streptococcus pyogenes</i> 4207	ATCC

Figura 20. Ceppi batterici e fungini utilizzati per la valutazione preliminare dell'attività antibatterica.

Per la valutazione dell'attività antibatterica i ceppi sono stati seminati in terreno solido NBA e tenuti in incubazione a 37 °C per 24 ore; in seguito è stata preparata per ogni ceppo una sospensione batterica in soluzione fisiologica, pari allo 0,5 dello standard turbidimetrico McFarland (soluzione di 0,05 mL di BaCl₂ all'1% e 9,95 mL di H₂SO₄ all'1%) corrispondente approssimativamente ad una sospensione batterica di 1 x 10⁷ UFC/mL.

Per l'inseminazione sono state utilizzate piastre Petri di 60 mm di diametro. In ciascuna piastra sono stati versati 7 mL di NBA, sciolto e mantenuto a 45 °C per circa 30 minuti.

Dopo solidificazione del terreno, le piastre sono state asciugate in un incubatore non ventilato a 37 °C e quindi trasferite a 4 °C per aumentare la consistenza del terreno.



Figura 21. Metodo dell'agar solido: il campione è disciolto in agar e posto nel solco centrale dove è attraversato dalla semina dei ceppi. A destra e a sinistra si leggono i controlli di crescita in assenza di campione.

Diametralmente, in ciascuna piastra, è stata tagliata ed asportata una striscia di terreno larga circa 6 mm. Lo spazio risultante è stato riempito con il

terreno NBA contenente i campioni di propoli sciolti in NBA a diverse concentrazioni comprese tra 2 mg/mL e 0,25 mg/mL (una concentrazione per piastra). Il saggio è stato effettuato seminando le sospensioni batteriche lungo linee tra loro parallele, che attraversavano perpendicolarmente la striscia di terreno contenente il campione da esaminare.

La lettura dei risultati è stata fatta dopo incubazione a 37 °C per 48 ore. Il campione è stato considerato dotato di attività antibatterica quando è stata osservata un'assenza di crescita batterica in corrispondenza della striscia contenente il campione. (Leite *et al.*, 2006; Altaie e Dryja, 1994).

7. RISULTATI



7.1 Caratterizzazione morfologica

Dall'analisi statistica dei 13 differenti parametri misurati sono stati ricavati i dati descrittivi, riguardanti la macromorfologia fogliare, mostrati in tabella 8, suddivisi per popolazione (o subpopolazione nel caso dei campioni toscani) campionata.

Dalla tabella 8 si può ricavare che il coefficiente di variazione totale medio è maggiore, 50,59, per i campioni raccolti a Santa Brigida, mentre il valore più basso, 27,85, si ha per i campioni della seconda popolazione spagnola.

	Santa Brigida	Spagna 1	Spagna 2	Spagna 3
Area fogliare	45.34	40.09	40.64	48.33
Perimetro	30.99	48.87	34.34	47.66
Lunghezza della foglia	23.99	20.21	21.57	17.90
Larghezza massima della foglia	46.67	25.19	17.64	20.14
LAR/LUN	127.55	15.87	16.17	13.69
Lunghezza della lamina	27.30	25.55	26.41	34.36
MPW	30.65	23.26	18.82	20.93
PPW	40.10	38.40	52.63	56.74
PW1	29.21	25.16	19.08	19.31
PW2	70.18	32.48	26.60	45.72
LB1	88.46	75.87	40.14	58.88
LB2	75.08	31.74	18.91	20.47
Lunghezza del picciolo	22.16	31.01	29.13	25.26
Media totale	50.59	33.36	27.85	33.03

Tabella 8. Coefficienti di variazione per le quattro popolazioni campionate.

	Santa Brigida			Spagna 1			Spagna 2			Spagna 3		
	Media	Deviazione standard	CV	Media	Deviazione standard	CV	Media	Deviazione standard	CV	Media	Deviazione standard	CV
Area fogliare	8.04	3.65	45.34	5.50	2.21	40.09	5.54	2.25	40.64	6.77	3.27	48.34
Perimetro	16.53	5.13	31.00	11.89	5.81	48.87	12.24	4.21	34.34	12.55	5.98	47.66
Lunghezza della foglia	7.20	1.73	23.99	5.79	1.17	20.21	5.36	1.16	21.57	6.11	1.09	17.90
Larghezza massima della foglia	2.20	1.02	46.67	1.81	0.46	25.19	2.04	0.36	17.64	2.28	0.46	20.14
LAR/LUN	0.35	0.44	127.55	0.31	0.05	15.88	0.39	0.06	16.17	0.37	0.05	13.69
Lunghezza della lamina	6.88	1.88	27.30	5.19	1.33	25.55	4.66	1.23	26.41	5.04	1.73	34.36
MPW	2.07	0.63	30.66	1.72	0.40	23.26	1.93	0.36	18.83	2.25	0.47	20.93
PPW	3.25	1.30	40.10	1.96	0.75	38.40	1.43	0.75	52.63	1.77	1.01	56.74
PW1	1.93	0.56	29.21	1.54	0.39	25.16	1.60	0.31	19.08	1.97	0.38	19.31
PW2	0.65	0.46	70.18	0.46	0.15	32.48	0.43	0.12	26.60	0.64	0.29	45.72
LB1	16.77	14.84	88.46	26.75	20.29	75.87	37.58	15.08	40.14	28.60	16.84	58.88
LB2	15.43	11.59	75.09	27.11	8.60	31.74	31.82	6.02	18.91	32.60	6.67	20.47
Lunghezza del picciolo	1.65	0.37	22.17	1.06	0.33	31.01	0.90	0.26	29.13	1.11	0.28	25.26
TOTALE	6.38	3.35	50.59	7.01	3.23	33.36	8.15	2.47	27.85	7.85	2.96	33.03

Tabella 9. Analisi statistica descrittiva: media, deviazione standard e coefficiente di variazione (CV) suddivisi per le quattro popolazioni (Santa Brigida, Spagna 1,2 e 3).

La tabella 10 riporta i pesi fattoriali per ciascuno dei tre fattori estratti dall'analisi delle componenti principali e la varianza spiegata da ciascun di essi.

	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3
Area fogliare	0.92		
Perimetro	0.75		
Lunghezza della foglia	0.92		
Larghezza massima della foglia		0.90	
LAR/LUN		0.93	
Lunghezza della lamina	0.87		
MPW		0.73	
PW2		0.94	
LB1			-0.83
LB2			-0.89
Autovalore	4.39	3.83	2.53
% variabilità	34	29	19

Tabella 10. Analisi delle componenti principali.

Il fattore 1 risulta essere il più importante e spiega il 34% della varianza; su di esso pesa il maggior numero di variabili. Il fattore 2 contribuisce per il 29% della varianza e su di esso agiscono, nell'ordine, la larghezza misurata perpendicolarmente alla lunghezza nella posizione corrispondente al 90% della lunghezza totale della lamina (PW2), il rapporto tra larghezza e lunghezza, la larghezza massima della foglia e infine la massima larghezza della lamina misurata in direzione perpendicolare alla lunghezza (MPW). Il terzo fattore influisce per il 19% ed è spiegato dall'angolo del lobo misurato nella posizione corrispondente al 25% della lunghezza totale della lamina (LB2) e da quello corrispondente al 10% della lunghezza totale della lamina (LB1).

	Effetto (F/R)	SS	Gradi di Libertà	MS	F	p
Fattore 1						
Popolazione	Fisso	67.1874	3	22.39580	31.27032	***
Pianta	Random	88.1120	39	2.25928	5.02750	ns
Popolazione*pianta	Random	17.2954	25	0.69181	0.84149	ns
Errore		739.0966	899	0.82213		
Fattore 2						
Popolazione	Fisso	4.5127	3	1.504240	0.897165	ns
Pianta	Random	68.9845	39	1.768834	0.460277	ns

Popolazione*pianta	Random	46.8662	25	1.874647	2.295736	***
Errore		734.1033	899	0.816578		
Fattore 3						
Popolazione	Fisso	47.8785	3	15.95951	17.25363	***
Pianta	Random	64.2484	39	1.64740	1.47723	ns
Popolazione*pianta	Random	23.5594	25	0.94238	1.10935	ns
Errore		763.6845	899	0.84948		

Tabella 11. Risultati dell'ANOVA a due vie (Modello Lineare Generale) condotta sui tre fattori estratti. *** P<0,001; n.s.: non significativo.

La prima componente estratta è risultata significativa per il fattore popolazione, così come la terza componente, mentre invece la seconda ha mostrato significatività solo nell'interazione tra popolazione e pianta.

Dall'analisi post-hoc HSD di Tuckey, si evince che per il fattore 1 le tre popolazioni spagnole risultano statisticamente simili, mentre un certo grado di similarità si ha anche tra la terza popolazione spagnola e la popolazione di Santa Brigida, il fattore 2 non discrimina le differenti popolazioni, mentre il fattore 3 distingue la popolazione italiana dalle tre spagnole.

	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3
Santa Brigida	AB	A	A
Spagna 1	C	A	B
Spagna 2	C	A	B
Spagna 3	BC	A	B

Tabella 12. Analisi post-hoc HSD di Tuckey condotta sui tre fattori che spiegano la totalità della variabilità. Lettere diverse indicano valori statisticamente differenti ad una P<0,05.

L'analisi discriminante mostra una certa discriminazione tra la popolazione italiana e spagnola legata soprattutto alla funzione discriminante 1, minore è la differenziazione legata alla funzione discriminante 2 (figura 22).

	Autovalore	Canonico R	Wilks Lambda	Chi-qdr	Gl	p-level
1	1.426833	0.766773	0.253893	220.0199	33	***
2	0.507461	0.580201	0.616157	77.7227	20	***
3	0.076620	0.266772	0.928833	11.8491	9	Ns

Tabella 13. Funzioni discriminanti estratte mediante approccio stepwise.

	Funzione discriminante 1	Funzione discriminante 2
LB1		-1.36
LB2		2.37
LAR/LUN	-3.90	-2.52
PW2		2.34
MPW	2.57	-4.12
Lunghezza della lamina	1.92	-1.50
Lunghezza della foglia	-2.44	1.07
PW1	-2.36	2.02
Larghezza massima della foglia	1.86	1.62

Tabella 14. Coefficienti standardizzati.

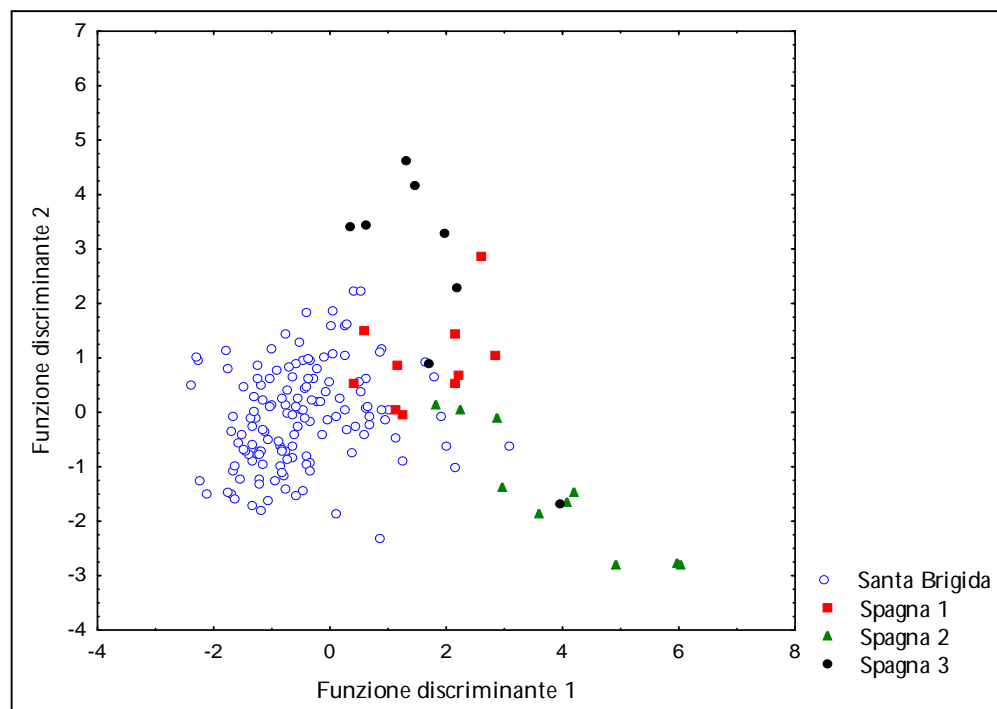


Figura 22. Analisi discriminante: grafico di dispersione dei singoli casi.

In conclusione, tra le differenti popolazioni di *Cistus laurifolius* analizzate, sembra esistere una certa variabilità morfologica statisticamente significativa. Resta però da sottolineare il fatto che l'approccio d'analisi morfologica classica non riesce a fornire una chiara interpretazione della varianza, essendo soprattutto legato a misure lineari e non a rapporti tra forma

e dimensione, maggiormente informativi in studi di questo tipo. Quindi in questo caso le informazioni ottenute dall'analisi morfologica devono essere correlate con quelle provenienti dall'analisi dei marcatori molecolari nucleari al fine di poter attribuire la diversità alla differenza ambientale o alla disomogeneità genetica generata dall'isolamento delle popolazioni

7.2 Progettazione e analisi dei marcatori molecolari nucleari

Sono stati sequenziati circa 1500 cloni della libreria genomica di piccoli frammenti random di DNA di cisto. Le sequenze sono state assemblate, passaggio necessario per rimuovere quelle ridondanti, producendo 1348 sequenze uniche (1305 singletons e 43 assemblaggi) di lunghezza media di 450 nt. Di quest'ultime soltanto 25 presentavano microsatelliti di-tri- o tetra nucleotidici ripetuti almeno 5 volte per le quali sono stati disegnati i primers.

La frequenza di microsatelliti rilevata dal sequenziamento della libreria random, pari a circa 1,8%, è risultata particolarmente bassa rispetto a quella rilevata per molte altre specie di piante, in genere vicina al 5% circa. Dei 25 potenziali marcatori, 10 sono stati scartati perché le sequenze fiancheggianti risultavano troppo corte per disegnare i primers.

Locus	Microsatellite
cislau01	(TC) ₅ composto(AAAG) ₄
cislau04	(AT) ₆ (A) ₆
cislau05	(AT) ₇
cislau06	(TCC) ₅ (TC) ₆
cislau07	(AT)
cislau09	(TC) ₆
cislau10	(TA) ₄ ...(GAAA) ₄
cisalu11	(TC) ₅
cisalu12	(AT) ₇
cisalu13	(AT) ₅
cislau14	(TG) ₅
cislau15	(AAG) ₅
cislau16	(TCC) ₅
cislau17	(TTC) ₄
cislau19	(TC) ₅

Tabella 15. Marcatori microsatelliti nucleari candidati.

I cloni selezionati sono stati sequenziali in entrambe le direzioni permettendo di disegnare 15 paia di primers utilizzando il software Primer3 (Rozen e Skaletsky 2000).

Dieci paia di primers hanno generato un prodotto di amplificazione della dimensione attesa, mentre gli altri tre o non hanno amplificato o hanno dato un prodotto troppo pronunciato con profilo multibanda.

Al fine di verificare robustezza e polimorfismo dei 10 marcatori sono stati analizzati 30 individui delle tre popolazioni spagnole (10 individui di ciascuna) e 30 della popolazione italiana. Sei dei dieci marcatori nuSSR hanno mostrato polimorfismo.

Locus	Sequenza 5'-3'	Motivo ripetuto	Fluoroforo	Profilo PCR	Dimensione dell'allele(bp)	N. di alleli	GenBank accession no.
cislau1	fw:TCGATCGGGTGAAAACAAAT	(TC)5	FAM	Td	227-255	7	JX946279
	rv:TTCCTTCCAGAGGCTTCTCA						
cislau5	fw:ACTCATTAAATTAGGTTGTTGAATGG	(AT)7	FAM	Td	318-320	2	JX946280
	rv:ATGATGCTTGGCTAGTTTATCC						
cislau7	fw:TCAAAAAGCTTCTTCCCCTCT	(AT)7	PET	Td	158-166	5	JX946281
	rv:GATGTATGATGAAGGGCAGG						
cislau11	fw:GCGAGATCCCCGAAACACT	(TC)5	PET	Td	163-167	3	JX946282
	rv:AAAAACCCTAGAAGTCCTCGA						
cislau12	fw:TAATTGTCGCTTTGCTGTGC	(AT)7	VIC	Td	202-232	15	JX946283
	rv:TCATGCACAAGTTGAATCAAGA						
cislau14	fw:GACAACCTCACGACTCTAAACG	(AAAG)4	NED	Td	180-184	2	JX946284
	rv:AAATTGGGCATGGACCAAG						

Tabella 16. Marcatori molecolari nucleari selezionati per le analisi del polimorfismo all'interno e tra le popolazioni saggiate.

Td: touch-down, amplificazione PCR con temperatura di appaiamento dei primers che parte da 60°C e scende di 1°C a ciclo per 10 cicli e continua 50°C.

Sul totale degli individui campionati nella popolazione italiana e sui 30 delle tre differenti popolazioni spagnole sono state analizzate le principali statistiche descrittive al fine di comparare la diversità genetica.

Popolazione	Locus	N _a	N _e	H _O	H _E	F
Popolazione1 (Italia)	Cislau1	9	1.084	0.037	0.077	0.527
	Cislau5	5	2.096	0.046	0.523	0.912
	Cislau7	5	2.638	0.456	0.621	0.266
	Cislau11	4	1.068	0.066	0.064	-0.029
	Cislau12	10	3.378	0.423	0.704	0.399

	Cislau14	5	1.175	0.105	0.149	0.293
Popolazione2	Cislau1	1	1.000	0.000	0.000	/
(Spagna1)	Cislau5	1	1.000	0.000	0.000	/
	Cislau7	3	2.151	0.900	0.535	-0.682
	Cislau11	1	1.000	0.000	0.000	/
	Cislau12	7	4.378	0.444	0.772	0.424
	Cislau14	2	2.000	1.000	0.500	-1.000
Popolazione3	Cislau1	1	1.000	0.000	0.000	/
(Spagna2)	Cislau5	1	1.000	0.000	0.000	/
	Cislau7	3	2.418	0.778	0.586	-0.326
	Cislau11	1	1.000	0.000	0.000	/
	Cislau12	7	2.492	0.667	0.599	-0.113
	Cislau14	2	1.385	0.333	0.278	-0.200
Popolazione4	Cislau1	1	1.000	0.000	0.000	/
(Spagna3)	Cislau5	1	1.000	0.000	0.000	/
	Cislau7	5	2.632	0.600	0.620	0.032
	Cislau11	3	2.740	0.700	0.635	-0.102
	Cislau12	2	2.000	1.000	0.500	-1.000
	Cislau14	2	2.000	1.000	0.500	-1.000

Tabella 17. Indici di diversità genetica suddivisi per popolazione e per locus all'interno di ogni popolazione.

Il più alto numero di alleli si ritrova nella popolazione 1, italiana, per il locus cislau12 con 10 alleli. Lo stesso locus, cislau12, è il più polimorfo anche nelle popolazioni 2 e 3, spagnole, con 7 alleli, mentre nella popolazione 4 il più alto valore è attribuito a cislau7.

Complessivamente nelle quattro popolazioni sono stati rilevati ai 6 loci un totale di 82 alleli, con una media di 13,6 alleli per locus. Tutte le caratteristiche dei loci polimorfi sono presentati nella tabella 17.

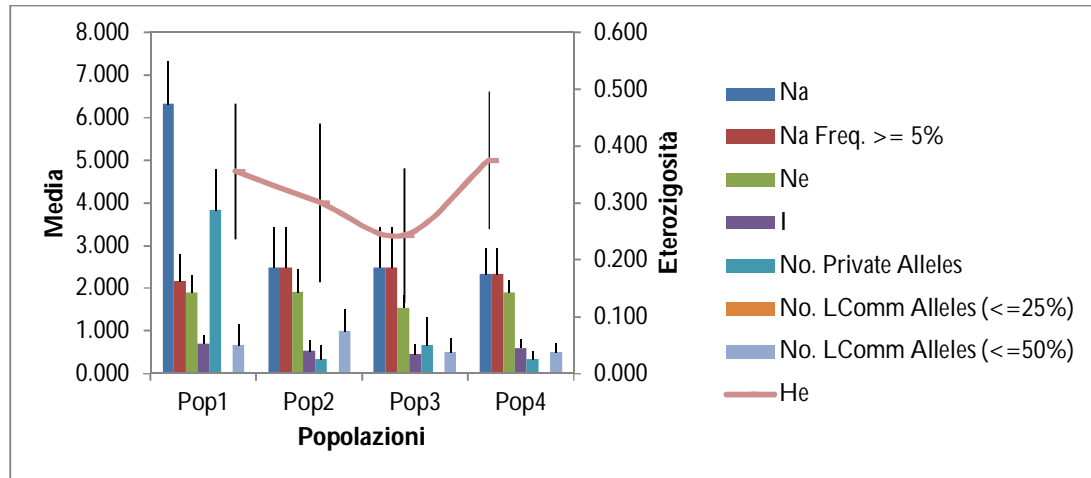


Figura 23. Pattern allelici delle quattro popolazioni analizzate.

I pattern allelici delle popolazioni sono rappresentati nel grafico in figura 23. Si può osservare come il più alto valore di eterozigosità (H_E) si ritrovi all'interno della popolazione 4 (Spagna) con un valore di 0,376, di poco superiore rispetto al valore di 0,356 della popolazione 1 (Italia). Le altre popolazioni spagnole, la popolazione 2 e 3, mostrano bassi livelli di eterozigosità.

La media dell'eterozigosità osservata (H_O) considerando tutte e quattro le popolazioni è di 0,356 con i più alti valori, rispettivamente di 0,550 e 0,391, nella popolazione 4 (Spagna) e nella popolazione 2 (Spagna). Il più basso valore di eterozigosità osservata, 0,189, si ritrova nella popolazione 1 (Italia).

	Popolazione1	Popolazione2	Popolazione3	Popolazione4
N	161.000	9.833	9.000	8.500
N_a	6.333	2.500	2.500	2.333
N_e	1.906	1.921	1.549	1.895
H_o	0.189	0.391	0.296	0.550
H_E	0.356	0.301	0.244	0.376
F	0.395	-0.419	-0.213	-0.518

Tabella 18. Valori medi degli indici calcolati, suddivisi per popolazione.

La varianza molecolare, sia all'interno che tra le popolazioni, è stata analizzata tramite il test AMOVA il quale si basa direttamente su dati molecolari.

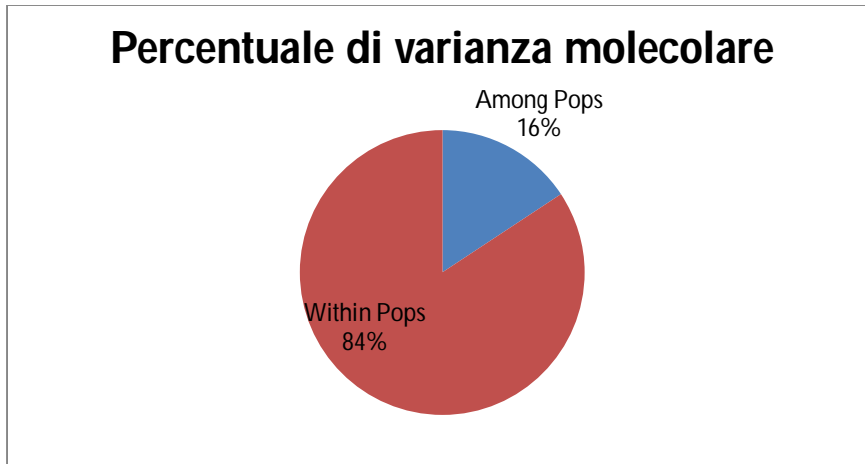


Figura 24. Percentuale di varianza molecolare calcolata secondo il test AMOVA

	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Tra popolazioni	3	20.097	6.699	0.285	16%
All'interno popolazioni	217	330.378	1.522	1.522	84%
Totale	220	350.475		1.807	100%

Tabella 19. Risultati test Amova

Nel grafico in figura 24 e dalla tabella 19 si può notare come il 16% della varianza totale sia da ascrivere a differenze tra popolazioni, mentre l'84% della varianza si riscontra all'interno delle popolazioni, rilevando quindi un grado di differenziazione piuttosto elevato.

Infine l'analisi della trasferibilità dei sei locus ad altre specie del genere *Cistus* ha rilevato che soltanto Cislau1 e Cislau11 (entrambi con quattro aplotipi differenti) amplificano per tutte le specie analizzate, mentre invece Cislau5 produce un prodotto soltanto in *C. salviifolius* e *C. monspeliensis*, Cislau7 in *C. albidus* e Cislau14 in *C. salviifolius*, *C. ladanifer* e *C. albidus* come mostrato in tabella 20.

Specie	Cislau1		Cislau 5		Cislau 7		Cislau 11		Cislau 14	
<i>C. salviifolius</i>	235	235	319	319	0	0	163	167	176	178
<i>C. ladanifer</i>	227	235	0	0	0	0	165	165	169	169

<i>C. albidus</i>	227	239	0	0	154	154	164	164	178	178
<i>C. monspeliensis</i>	219	235	328	328	0	0	164	164	0	0
<i>C. x purpureus</i>	227	235	0	0	0	0	163	165	0	0

Tabella 20. Trasferibilità dei sei loci microsatellite testati su cinque diverse specie presenti in Toscana.

7.3 Analisi marcatori plastidiali

Soltanto i marcatori ccmp3, ccmp6 e cs3 hanno prodotto un amplificato e di questi ccmp6 è risultato monomorfo, con un frammento di 100bp, è quindi escluso dalle analisi successive.

Per le analisi dei marcatori plastidiali polimorfici sono state considerate due popolazioni distinte, la popolazione1 italiana e la popolazione2 in cui sono stati raggruppati tutti gli individui spagnoli.

Il prodotto di amplificazione del ccmp3 ha rilevato la presenza di tre differenti varianti di lunghezza (111,112 e 113 bp), mentre invece il cs3 quattro (167,169,170,172 bp).

Complessivamente il ccmp3 e il cs3 hanno dato origine a 7 differenti aplotipi mostrati in tabella 21.

		Lunghezza dei frammenti amplificati (bp)	
Aplotipo	Numero di individui	ccmp3	cs3
CS1	44	111	172
CS2	12	111	170
CS3	1	113	172
CS4	6	111	167
CS5	2	111	169
CS6	1	112	172
CS7	1	113	170

Tabella 21. Aplotipi originati dal ccmp3 e cs3.

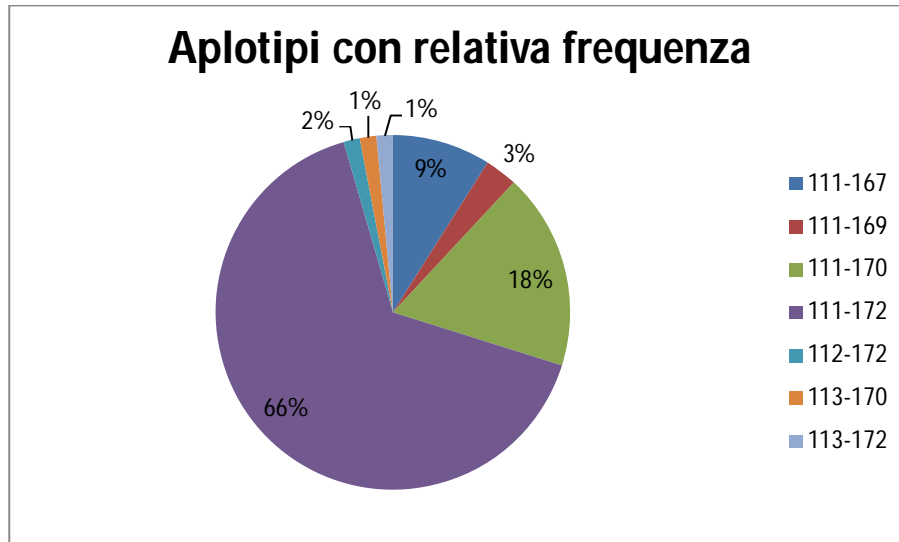


Figura 25. Aplotipi con relativa frequenza.

L'analisi dei parametri di diversità genetica ha evidenziato un valore di diversità, 0,418, maggiore per la popolazione2 (Spagna).

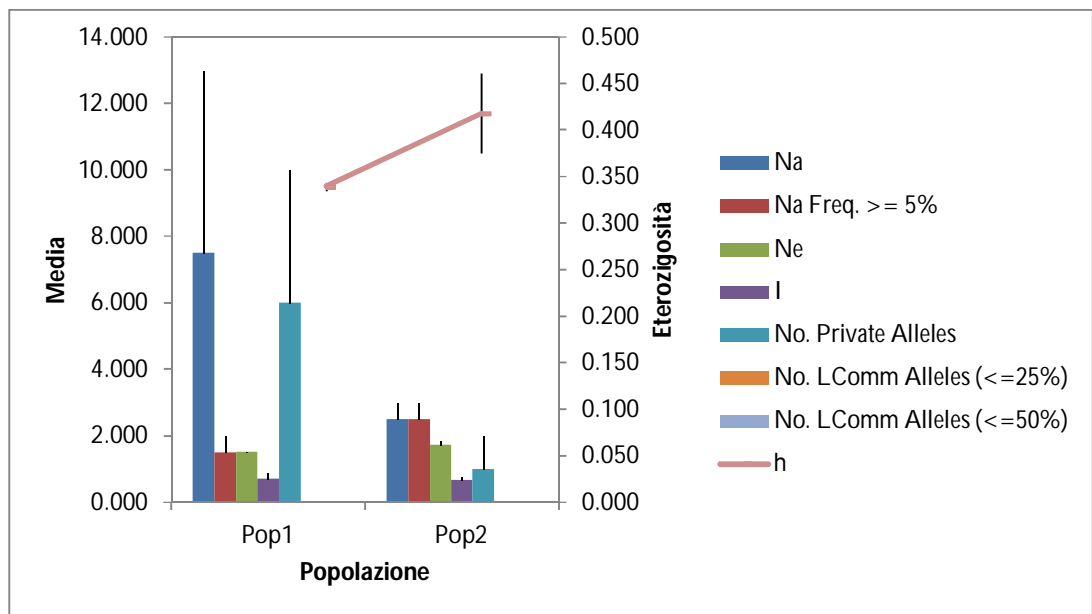


Figura 26. Pattern allelici delle due popolazioni analizzate.

	Popolazione1	Popolazione2
N	125.500	12.000
N_a	7.500	2.500
N_e	1.513	1.728
H	0.339	0.418

Tabella 22. Media degli indici valutati per i marcatori plastidiali *ccmp3* e *cs3*, suddivisi per popolazione.

7.4 Caratterizzazione fitochimica

Tutti gli estratti prodotti sono stati sottoposti a screening fitochimico, analisi dei polifenoli totali e dei flavonoidi.

Gli spettri UV degli estratti etanolic di cisto mostrano profili simili con un solo massimo intorno ai 280 nm, caratteristico dei costituenti di natura fenolica, e una spalla tra 320 e 350 nm, tipica della frazione flavonoidica. Lo screening fitochimico ha confermato la presenza negli estratti di flavonoidi e tannini, evidenziati specificamente con il saggio della vanillina, oltre a triterpeni steroidi analizzati con il saggio Liberman Bouchard.

Gli altri saggi non hanno fornito evidenze riguardo la presenza di altre classi di metaboliti.

L'estratto ENES è risultato migliorativo per la resa quantitativa in tutti i costituenti rispetto a EMTS ed ha confermato l'importante contributo fornito dalla tecnica del Naviglio Estrattore.

L'estratto da foglie fresche EMTF conserva qualitativamente gli stessi principi attivi degli estratti da materiale essiccato ma, per la presenza di acqua che costituisce circa il 61% del peso del fresco, a parità di peso ha un tenore in principi attivi che coerentemente è circa il 40% di EMTS

<i>SCREENING FITOCHIMICO</i>		
Saggio	Analita	Risultato
DRAGENDROFF	ALCALOIDI	ASSENTI
ESTRATTO ETANOLICO		
CATECHINE	CATECHINE	ASSENTI
LIBERMAN BOUCHARD	TRITERPENI STEROIDEI	PRESENTI

CLORURO FERRICO	FENOLI E TANNINI	PRESENTI
SHINODA	FLAVONOIDI	ASSENTI
ANTOCIANIDINE	ANTOCIANIDINE	ASSENTI
ESTRATTO ACQUOSO		
Saggio		
ALCALOIDI	ALCALOIDI	ASSENTI
TANNINI	TANNINI	PRESENTI
FLAVONOIDI	FLAVONOIDI	PRESENTI

Tabella 23. Risultati screening fitochimico.

Mediante le reazioni colorimetriche di Folin-Ciocalteu e lo stesso saggio con vanillina è stato possibile quantificare i polifenoli totali e i flavan-3-oli totali (catechine, flavanoli e proantocianidine) nell'estratto ENES e mediante spettrofotometria diretta, utilizzando come standard di riferimento il campferolo, è stato possibile quantificare i flavonoidi totali, che tipicamente hanno un massimo d'assorbimento tra 350 e 360 nm, come flavoni, flavonoli e calconi (tra 345 e 360 nm) (Øyvind et al., 2006).

La tabella 24 riporta l'analisi quantitativa della frazione polifenolica dell'estratto ottenuto mediante macerazione tradizionale da foglie fresche e secche, mentre invece la tabella 25 di quello ottenuto con il Naviglio Estrattire.

EMTF	
Polifenoli totali (% su droga fresca)	0,462% +/- 0,086%
EMTS	
Polifenoli totali (% su droga secca)	1,157% +/- 0,341%

Tabella 24. Analisi quantitativa della componente polifenolica degli estratti da droga fresca e secca ottenuti per macerazione tradizionale.

ENES	
Polifenoli totali (% su droga secca)	1,969% +/- 0,177%
Flavan-3-oli totali (% su droga secca)	0,470% +/- 0,075%

Tabella 25. Analisi quantitativa della componente polifenolica dell'estratto ottenuto tramite Naviglio Estrattore

L'estratto da foglie secche è quello che mantiene maggiormente inalterate le proprietà della specie. Su questo abbiamo lavorato ottimizzando prima la metodica di estrazione mediante il Naviglio Estrattore e procedendo poi con le analisi DPPH, analisi HPLC e GM, e gascromatografia per quanto riguarda la componente volatile.

I campioni esibiscono una forte capacità antiradicalica in virtù del loro contenuto in polifenoli ed i valori di attività del fitocomplesso sono molto vicini a standard di riferimento come l'acido ascorbico ed anche a sostanze polifenoliche pure come idrossitirosolo o acido gallico, che hanno un IC_{50} intorno ai 5 $\mu\text{g/mL}$.

Il tracciato TIC (corrente ionica totale), confrontato con l'acquisizione DAD a 280 nm (figura 27), mostra che la maggior parte dei costituenti estratti con etanolo al 60% V/V sono di natura fenolica; infatti i principali picchi dei due cromatogrammi corrispondono.

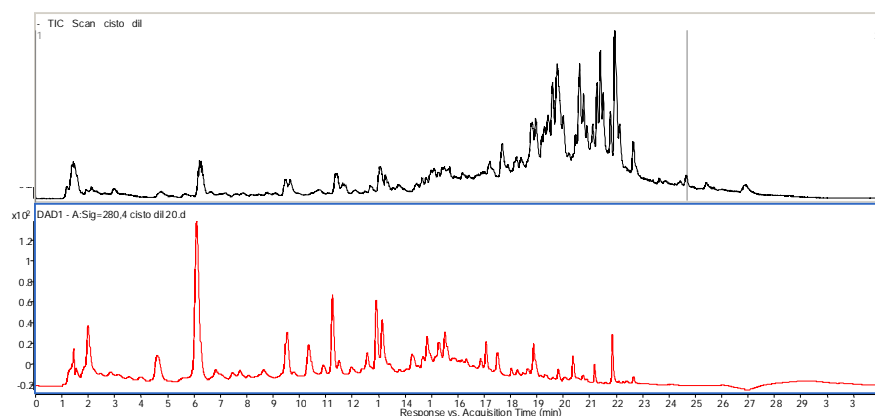


Figura 27. Analisi HPLC-MS dell'estratto ENES di *Cistus laurifolius* : TIC acquisito in negativo e DAD a 280 nm

Dall'integrazione delle aree dei picchi è possibile individuare come costituente principale dell'estratto di cisto quello con RT (tempo di ritenzione) a 6,24 che ha come spettro di massa una caratteristica frammentazione polimerica (164-338-676) e che probabilmente è l'acido p-cumarico (acido 4-idrossicinnamico).

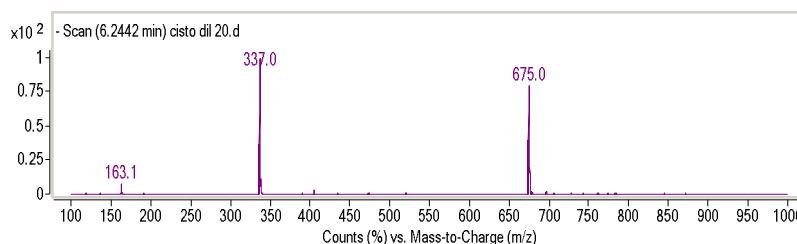


Figura 278. Spettro di massa dell'acido p-cumarico

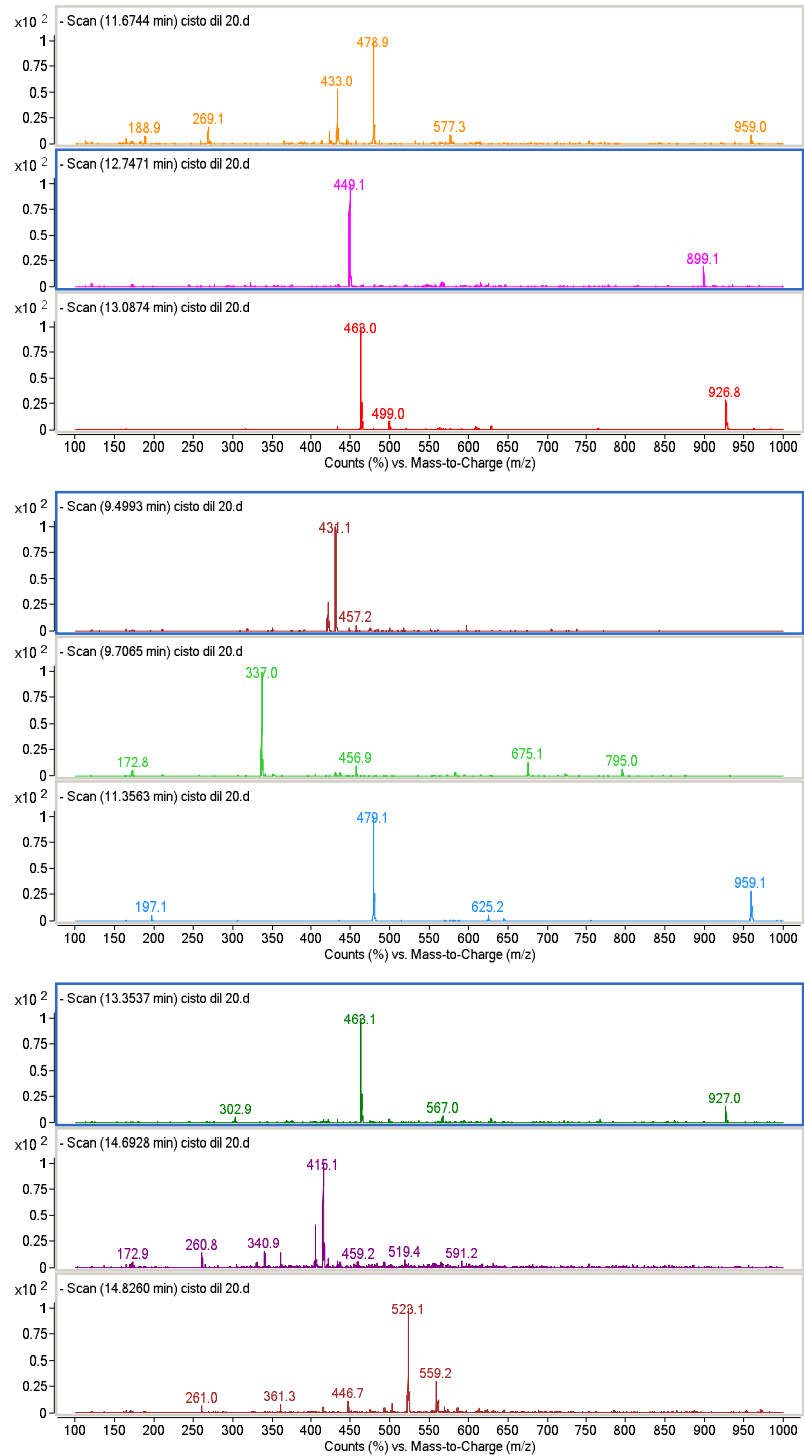
Un altro costituente con un'area tra le maggiori dello spettro DAD è quello a RT 1,47 che sembrerebbe essere un diglicoside della miricetina.

A RT 9,50 è individuabile un componente la cui attribuzione è relativamente univoca (m/z 432): campferolo-3-ramnoside. Altro flavonoide abbastanza semplice da identificare è quello a RT 11,36 (m/z 480), miricetina-3-glucoside.

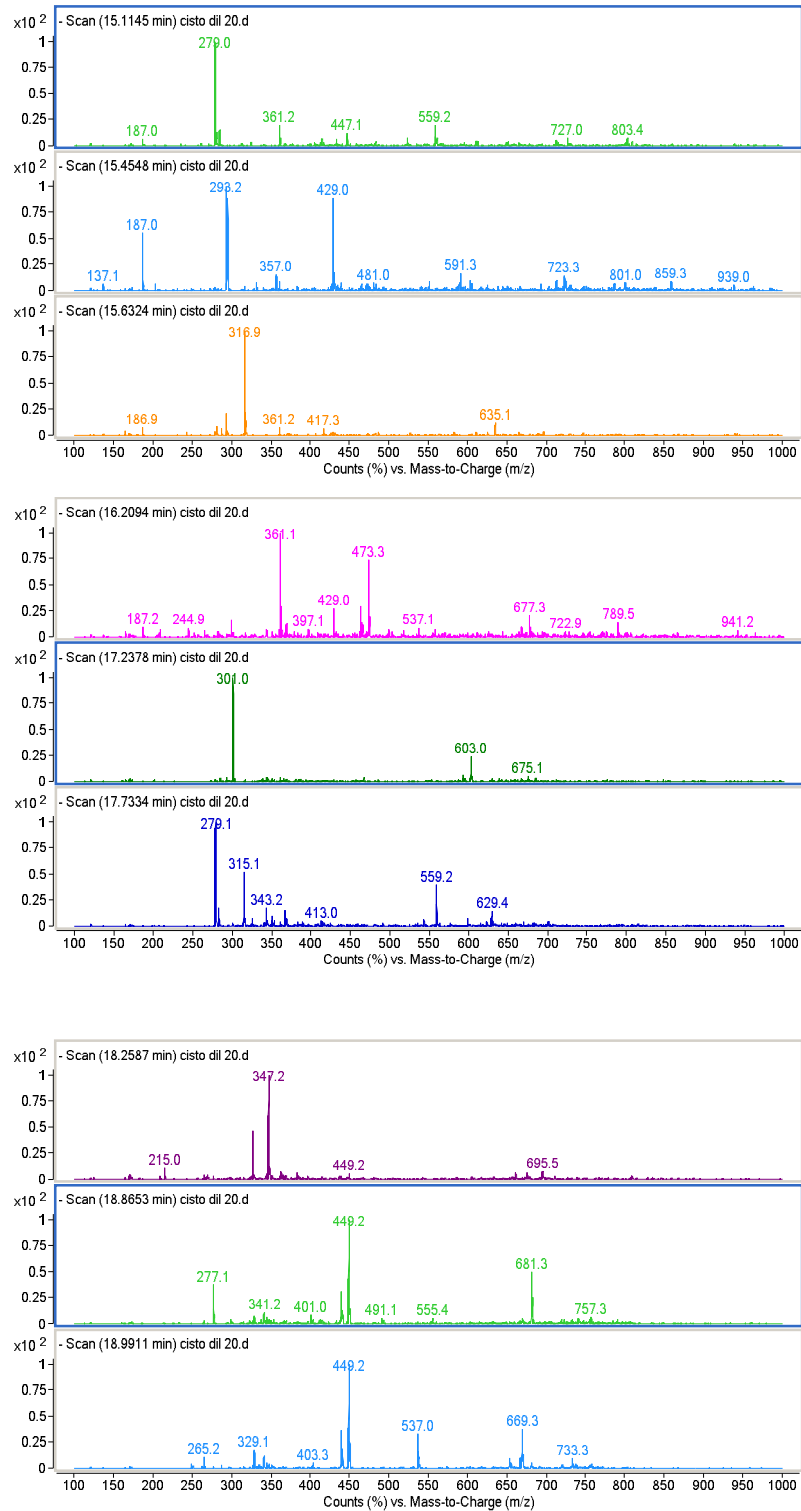
A RT 13,08 e 13,35 sono individuabili gli ultimi costituenti maggioritari individuabili nello spettro DAD, isomeri di un flavonoide con caratteristica frammentazione e m/z 464, quercetina-3-glucoside e quercetina-7-glucoside.

I composti rivelati e appena descritti per la prima volta nell'estratto alcolico di cisto rappresentano oltre l'80% dei costituenti totali e si accompagnano a campferolo, miricetina e quercetina agliconi e glicosidi e derivati cinnamici. Gli spettri di massa di tutti i picchi sono riportati.

Analisi morfologica e molecolare della popolazione toscana di *Cistus laurifolius* L.



Analisi morfologica e molecolare della popolazione toscana di *Cistus laurifolius* L.



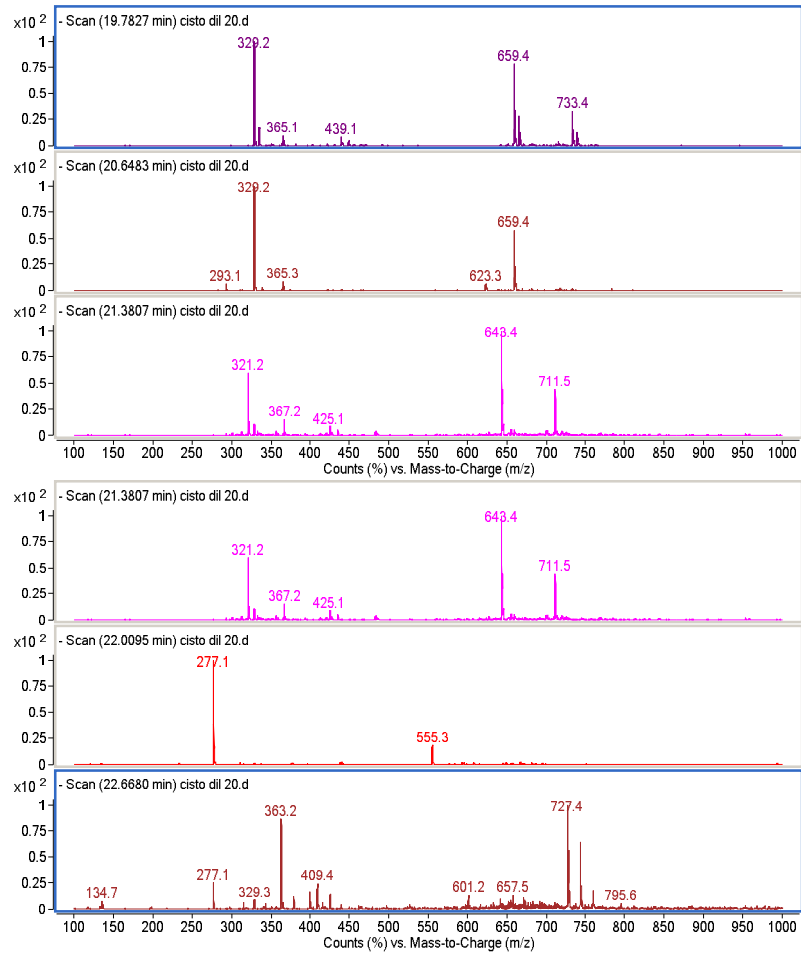


Figura 28. Spettri di massa dei costituenti di *Cistus laurifolius*

Le analisi gascromatografiche hanno invece fornito informazioni riguardanti la componente volatile presente nelle foglie di *Cistus laurifolius* confrontata poi con quella dell'altra specie, dello stesso genere, presente a Santa Brigida.

	<i>C. laurifolius</i>		<i>C. salviifolius</i>	
	Media	S.E.	Media	S.E.
PICCO1	6.5	0.1	0.0	0.0
α _PINENE	22.6	1.1	5.3	1.4
CANFENE	37.6	0.2	0.0	0.0
_2_ESENALE	0.9	0.3	17.4	1.9
β _PINENE	4.9	0.6	42.3	3.3
SABINENE	0.1	0.1	0.0	0.0
MIRCENE	1.2	0.1	9.4	0.3
LIMONENE	1.1	0.1	4.4	1.1

PICCO9	0.2	0.1	0.7	0.7
PICCO18	1.6	0.6	0.0	0.0
PICCO19	0.8	0.5	0.0	0.0
CANFORA	1.2	0.1	0.0	0.0
PICCO21	0.4	0.1	1.2	1.2
TERPINEN-4-OLO	1.6	0.2	0.0	0.0
PICCO25	6.6	0.5	0.0	0.0
PICCO29	0.6	0.1	0.0	0.0
CARVONE	0.1	0.1	0.0	0.0
PICCO31	4.1	0.6	0.0	0.0
PICCO32	0.8	0.1	9.5	2.1
PICCO34	2.4	0.9	0.0	0.0
PICCO35	1.1	0.4	0.0	0.0
β _CARIOFILLENE	0.1	0.1	0.0	0.0
PICCO38	1.5	0.5	0.0	0.0
PICCO39	1.5	0.2	0.0	0.0
PICCO40	1.8	0.7	0.0	0.0
PICCO41	1.8	0.5	0.0	0.0
PICCO46	2.7	1.0	0.0	0.0

Tabella 26. Media e errore standard dei principali picchi identificati nelle due differenti specie.

Dalla tabella 26 si può notare chiaramente come *C. laurifolius*, con 27 differenti picchi, risulti molto più ricco in composti volatili rispetto a *C. salviifolius*, il quale ne ha soltanto 8, con una differenza che discrimina nettamente le due specie come si può chiaramente osservare anche dai due cromatogrammi in figura 29.

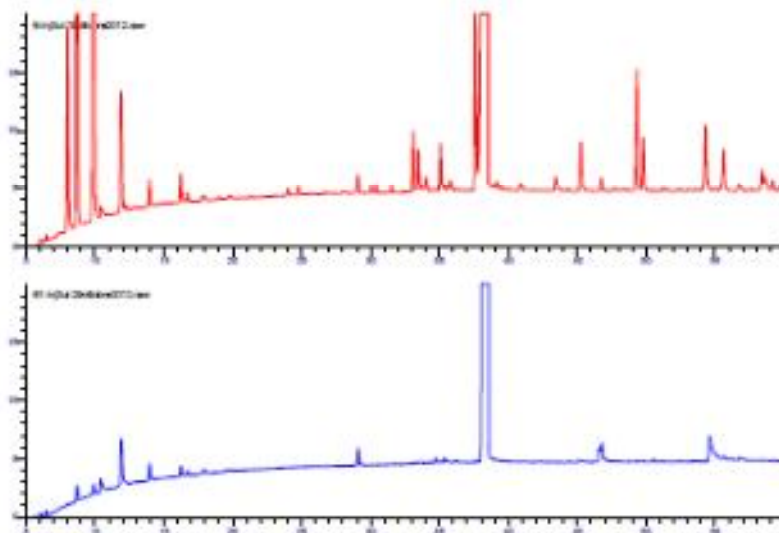


Figura 29. Confronto tra il cromatogramma di *Cistus laurifolius* (rosso) e *Cistus salviifolius* (blu)

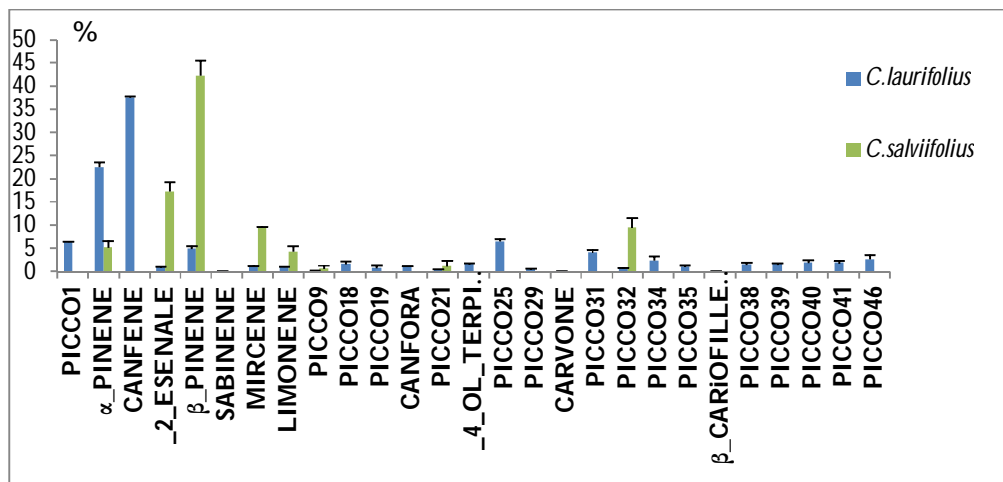


Figura 30. Percentuale dei vari composti organici volatili presenti nelle due specie di cisto analizzate

Anche dal grafico in figura 30, il quale mostra la percentuale dei vari composti presenti nelle due specie, si può osservare come *C. laurifolius* sia caratterizzato essenzialmente per la presenza di canfene come composto maggioritario, mentre *C. salviifolius* per la presenza di β-pinene.

Quest'analisi preliminare sarà approfondita al fine di poter identificare i 16 picchi (59% del totale del totale) rimasti indeterminati che comunque non rappresentano metaboliti a concentrazioni significative.

Il test del DPPH è stato condotto su ENES in modo tale da apprezzare la variazione della capacità antiradicalica in relazione alla concentrazione dei campioni.

La risposta ottenuta, tipicamente, identifica una relazione lineare per % di inibizione del radicale DPPH comprese tra il 20% e l'80%, mentre al di sopra e al di sotto di tali valori si osservano curve che si appiattiscono in un *plateau*.

Il test è stato condotto valutando per ogni campione almeno 5 concentrazioni cui rispondessero attività comprese tra il 20% e l'80% e dalla curva dei valori di inibizione è stata estrapolata la concentrazione che inibisce il 50% del radicale DPPH, la IC₅₀.

In tabella 27 sono riportati i valori di IC₅₀ del campione.

Campione	IC ₅₀ % estratto ENES
ENES	0.168457 %

Tabella 27. IC₅₀ dell'estratto ENES nel test DPPH dell'attività antiradicalica.

7.5 Test *in vitro*

La vitalità cellulare, valutata con il test della colorazione con Trypan Blue, dopo trattamento dei linfomonociti con ENES e EMTF a concentrazione di 1:250 e 1:500, non ha mostrato una variazione significativa rispetto al controllo. Alla concentrazione minima, controllo e campioni hanno mostrato valori di vitalità esattamente sovrapponibili. La percentuale di vitalità alla concentrazione massima è riportata in tabella 28 e conferma assenza di tossicità degli estratti.

Campione	vitalità %
controllo	92,54 ± 1,81
ENES	92,88 ± 1,87
EMTF	89,79 ± 2,04

Tabella 28. Vitalità cellulare percentuale con il test della colorazione con Trypan Blue dei linfomonociti trattati con estratto ENES e EMTF.

Una considerazione che è possibile ricavare alla luce delle analisi chimiche e dei dati di tossicità sperimentali e di letteratura riguarda l'ampia presenza di acido para-cumarico nella specie che, sebbene sicuro come tale, come dimostrano i test *in vitro*, *in vivo* potrebbe subire una conversione, generalmente catalizzata dal citocromo P450, in cumarina, molecola dotata di potere anticoagulante, che potrebbe quindi rappresentare la chiave di lettura dell'effetto tossico talvolta osservato dopo ingestione della specie.

Visti i risultati soddisfacenti ottenuti tramite il saggio del DPPH ho voluto indagare, a livello cellulare, l'attività antiossidante dell'estratto di cisto ENES.

Il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari in caso di danno provocato da stimoli ossidativi è quanto si richiede ad una sostanza antiossidante per essere efficace *in vivo*.

Il test dell'incorporazione dello ioduro di propidio su colture di cellule tubulari renali stimulate con perossido di idrogeno non ha fornito dati soddisfacenti per quanto riguarda le proprietà antiossidanti dell'estratto di *Cistus laurifolius* ENES. La linea cellulare delle tubulari renali è stata selezionata perché risponde molto bene agli stimoli di tipo ossidativo.

Le tubulari controllo, durante tutte le 24 ore di osservazione, non hanno visto incrementare i valori di fluorescenza e il rapporto di lettura rispetto al tempo 0 (t_0) è rimasto compreso tra 1 e 1,8.

Tutti i gruppi sperimentali di cellule trattate con perossido di idrogeno hanno mostrato un marcato incremento di fluorescenza dopo la prima ora di osservazione che si è mantenuto nelle 24 ore.

Osservando i gruppi di cellule coincubate con perossido di idrogeno e estratto di cisto si evidenzia come il prodotto non riesca a proteggere le tubulari dal danno ossidativo.

Come evidenziato dalla tabella 29, l'estratto non è efficace a nessuna delle concentrazioni testate: 1:250 e 1:500 e non fornisce protezione alle membrane cellulari dalla penetrazione del propidio.

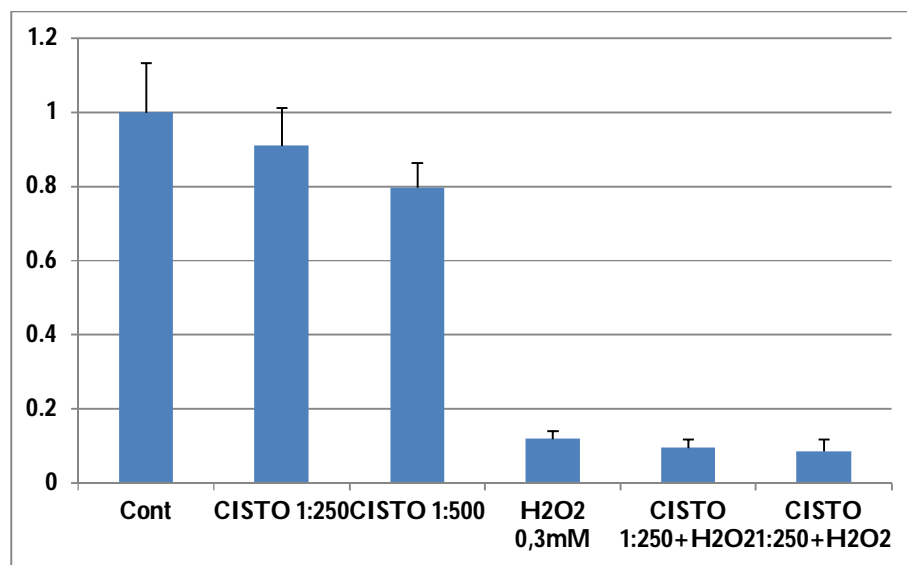


Tabella 29. Attività citoprotettiva di cisto su cellule tubulari renali stimulate con perossido di idrogeno, valutata nelle 24 ore.

Nonostante il risultato negativo, il test sulle tubulari ha messo in evidenza la diversa risposta di un test su colture cellulari rispetto ai test di tipo

chimico come il DPPH e ha permesso di comprendere che il fitocomplesso del cisto, alle concentrazioni testate, non è in grado di intercalarsi nelle membrane cellulari ed esplicitare *in situ* la sua potenziale attività scavenger.

I saggi microbiologici, volti ad indagare una possibile attività antibatterica, già segnalata in letteratura, sebbene solo per l'estratto etanoloico, hanno messo in luce che il campione ENES non ha azione battericida sui ceppi Gram +, Gram – e su quelli di *Candida albicans* testati alle concentrazioni testate di 1:250 e 1:500.

8. CONCLUSIONI



Lo scarso numero di lavori riguardanti *Cistus laurifolius*, unito all'importanza che riveste la specie in Italia e in particolare in Toscana, ha spinto ad intraprendere uno studio volto ad analizzare, sia a livello morfologico che molecolare, la popolazione toscana.

Raccogliere informazioni su questa specie, soprattutto riguardanti la variabilità nella struttura e il grado di conservazione genetica, significa poter avere a disposizione un solido substrato di conoscenze per la progettazione di strategie di conservazione e gestione della risorsa, sia a livello di specie che di geni.

La variabilità morfologica risulta essere statisticamente significativa per la popolazione italiana, ma questa non mostra una netta dipendenza dall'ambiente, infatti soltanto un fattore riesce a discriminare, seppur non nettamente, la popolazione italiana dalle tre spagnole.

L'approccio d'analisi morfologica classica non è riuscito a fornire una chiara interpretazione della varianza, essendo soprattutto legato a misure lineari e non a rapporti tra forma e dimensione, maggiormente informativi in studi di questo tipo.

D'altra parte questa difficoltà può essere superata cercando di interpretare il dato comparandolo con quelli derivanti della valutazione della variabilità genetica.

Il più alto numero di alleli è stato trovato per il locus cislau12 con 10 alleli della popolazione di Santa Brigida (popolazione 1). Complessivamente nelle quattro popolazioni sono stati rilevati ai 6 loci un totale di 82 alleli, con una media di 13,6 alleli per locus.

Il più alto valore di eterozigosità si è ritrovato all'interno della popolazione 4 (Spagna) con un valore di 0,376, di poco superiore rispetto al valore di 0,356 della popolazione 1 (Italia) (figura 21). Le altre popolazioni spagnole, la popolazione 2 e 3, mostrano bassi livelli di eterozigosità.

Le differenze morfologiche sono da attribuirsi all'ambiente più caldo e, soprattutto, più arido in cui vegetano le popolazioni spagnole ma il diverso grado di eterozigosi non permette di ritenere che esse siano solo un aspetto fenotipico, ma possono essere spiegate sulla base dell'influenza della disomogeneità genetica generata dall'isolamento della popolazione di Santa Brigida.

Da ciò si può dedurre chiaramente come la popolazione di Santa Brigida abbia mantenuto una buona conservazione genetica, garantita soprattutto dall'elevato numero di individui distribuiti in un'area ristretta. Infatti la diversità genetica viene garantita da diversi fattori, alcuni positivi (incrocio tra individui differenti e flusso genico) e altri negativi (inbreeding, isolamento genetico, riduzione del numero di individui). In popolazioni, come nel nostro caso, ampie e numerose, si ha un equilibrio tra questi fattori e di conseguenza una buona diversità genetica.

Tutti i parametri riguardanti la diversità genetica analizzati fanno inoltre ipotizzare che Santa Brigida possa essere definita come area rifugio per *Cistus laurifolius*. Le aree rifugio, areali geografici limitati in cui le specie animali e vegetali hanno trovato riparo durante l'ultima glaciazione, infatti sono state zone ad elevato tasso di differenziazione, da cui si sono originate anche numerosi endemismi (Linder, 2003; Hopper e Gioia, 2004; Thompson, 2005).

La popolazione di cisto a Santa Brigida, distribuita in un'areale ristretto, ma d'altra parte composto da un copioso numero di individui che mantengono una certa differenziazione morfologica e un'elevata differenziazione genetica con un numero di alleli elevato, porta a concludere che la sua presenza sia di origine naturale e non antropica, come specie relittuale, legata agli eventi glaciali del Quaternario.

Dalla sua area di rifugio il cisto non ha mai messo in atto meccanismi di migrazione nei periodi interglaciali, come spesso è stato osservato per altre specie vegetali che animali, che lo ha portato a colonizzare nuovi habitat idonei nella penisola italiana, o pur avendoli messi in atto non è riuscito a sopravvivere poiché non sussistevano le stesse condizioni.

Risulta quindi importante considerare la fragilità dell'habitat in cui si trova distribuito, cambiamenti climatici e riduzione dell'areale di sviluppo della specie, sempre di più costretta a competere con altre specie che si ritrovano in questo territorio, unito all'impatto antropico, determinano il venir meno di certe condizioni necessarie per lo sviluppo del cisto e potrebbero portare ad una contrazione della popolazione, con conseguente perdita di diversità e compromissione della presenza.

Di conseguenza aver attestato l'origine naturale e non antropica, come ascriveva la leggenda, della popolazione di Santa Brigida, il suo grado di

differenziamento e le minacce a cui può andar incontro, è risultato necessario per poter pianificare e intraprendere interventi di conservazione. Quindi sarà importante valutare interventi di conservazione *in situ* che puntino a mantenere le condizioni idonee per il mantenimento della popolazione, ma anche e soprattutto interventi *ex situ* al fine di conservare la variabilità genetica del germoplasma e quindi la possibile rigenerazione, riproduzione e moltiplicazione della specie.

L'elevata differenziazione genetica è stata anche confermata dai dati dell'analisi dei microsatteliti plastidiali.

Una volta compresa l'origine autoctona della specie si potrà proseguire andando a comprendere le sue dinamiche di espansione nel bacino del Mediterraneo procurandosi esemplari di provenienza francese, marocchina e turca.

La caratterizzazione fitochimica invece ha voluto indagare la composizione, a livello dei metaboliti secondari, della specie al fine di approfondire la discrepanza esistente tra gli studi portati avanti dai ricercatori spagnoli e da quelli turchi. L'intento, portato avanti anche grazie a studi *in vitro* su colture cellulari, è stato quello di ipotizzare per il cisto un possibile impiego a fini terapeutici per poter così valorizzare, anche attraverso coltivazioni *ex situ*, una specie endemica per la flora toscana.

L'analisi HPLC e gascromatografica non ha messo in luce la presenza di composti ritenuti tossici e quindi nocivi per il bestiame che possa pascolare nell'area in cui è presente la specie, come indicato dai ricercatori spagnoli. D'altra parte l'HPLC ha evidenziato la presenza di acido para-cumarico (RT 6,24), composto sicuro come tale, come è stato anche dimostrato dai test *in vitro*, ma tossico allorquando venga convertito, *in vivo* mediante l'azione del citocromo P450, in cumarina, molecola anticoagulante che potrebbe aver causato la morte del bestiame in più casi segnalata dai ricercatori spagnoli.

Inoltre dall'analisi gascromatografica è emersa una netta differenza in composti organici volatili tra le due specie presenti a Santa Brigida, caratteristica che ci fa presupporre non una strategia di adattamento ad uno stesso ambiente, ma una risposta dovuta a meccanismi di difesa differenti (protezione da animali erbivori, difesa contro i patogeni, supporto meccanico,

barriera contro l'invasione microbica, attrazione per gli impollinatori e per la dispersione del seme, inibitori di crescita delle piante in competizione).

Per quanto riguarda invece la parte di ricerca applicativa l'estratto idroalcolico da foglie secche di cisto, utilizzato per i vari test, non ha mostrato spiccate proprietà fitoterapiche alle concentrazioni saggiate. Il valore incoraggiante riscontrato per il potenziale antiossidante (DPPH), non è stato poi confermato da una protezione della membrana cellulare delle cellule tubulari renali, come ci si poteva attendere da un estratto caratterizzato prevalentemente in polifenoli. Anche le proprietà antimicrobiche e antifungine, quest'ultime già descritte in letteratura per il cisto (Simeray, J., *et al.*, 1982), nel nostro caso non hanno trovato conferma. In particolare Simeray indicava l'efficacia del cisto laurino nei confronti di *Candida albicans*, fungo sensibile al trattamento con oli essenziali. Nel mio caso non ho potuto confermare questa proprietà poiché nell'estratto idroalcolico prodotto da foglie secche mancava del tutto la componente volatile che sarebbe potuta essere efficace nei confronti di *Candida albicans*.

Visti questi risultati bisognerà prevedere per il cisto un'estrazione differente, probabilmente risulterà maggiormente idoneo un liofilizzato da foglie secche da impiegare come estratto in applicazioni topiche, al fine di superare il problema legato alla conversione dell'acido para-cumarico, per le sue potenzialità, risultate dalla valutazione DPPH del suo potere antiossidante, radical scavenger.

9. BIBLIOGRAFIA



AA.VV., (2003) - Piano Regolatore Generale. Piano Strutturale. L'analisi del paesaggio agrario e naturale. Comune di Pontassieve.

Allioni C., (1785) - Flora Pedemontana, sive enumeratio methodica stirpium indigenarum Pedemontii. J.M. Briolus. Torino.

Altaie S.S., Dryja D., (1994) - Detection of group B *Streptococcus*. Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. Diagn Microbiol Infect Dis, 18(3):141-144.

Arrigoni P.V., (1998) - La vegetazione forestale. Serie "Boschi e macchie di Toscana". Edizioni Regione Toscana. Firenze.

Arrington J.M., Kubitzki K., (2003) - Cistaceae. In K. Kubitzki, C. Bayer: The families and genera of vascular plants. Vol. V. Springer. Berlin.

Ballesteros Moreno E., Santamaría Borra F., (1969) - Intoxicación por *C. laurifolius* del ganado cabrío de Used (Zaragoza) in Actas de Sociedad Ibérica de Nutrición Animal VII Reunión Científica pp. 89-90.

Ballesteros Moreno E., Hernández Gómez J.M., (1969) - Acción muscarínica de los extractos acuosos del *C. laurifolius* sobre íleon aislado de cobaya in Anales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza 4: 103 et seq.

Ballesteros Moreno E., (1970) - Intoxicación por Cistáceas in Terapéutica Veterinaria. Biohorm. (Madrid) 5-9.

Ballesteros Moreno E., Val Calvete E., (1969) - Alteraciones hepáticas y renales producidas experimentalmente en ganado lanar y conejo por extractos de *C. laurifolius* in Anales de la Facultad de Veterinaria Zaragoza 4: 97 et seq.

Ballesteros Moreno E., García Poblete E., (1970) - Alteraciones hepáticas y renales en la intoxicación espontánea por *C. laurifolius* in Actas de la Sociedad Ibérica de Nutrición Animal VIII Reunión Científica pp. 107-112.

Ballesteros Moreno E., Montañes García D.L., (1970) - Contenido en microminerales del *C. laurifolius* in Actas de la Sociedad Ibérica de Nutrición Animal VIII Reunión Científica pp. 113-115.

Ballesteros Moreno E., Santamaría Borra F., (1969) - Intoxicación por *Cistus laurifolius* del ganado cabrío de Used (Zaragoza) in Actas de la Sociedad Ibérica de Nutrición Animal. III. Reunión Científica. pp. 89 et seq.

Ballesteros Moreno E., Santamaría Borra F., (1969) - Acción estimulante sobre la musculatura lisa uterina, del extracto acuoso del *Cistus laurifolius* in Anales de la Facultad de Veterinaria Zaragoza 4: 93-6.

Ballesteros Moreno E., & Santamaría Borra F., (1971) - Acción estimulante sobre la musculatura lisa uterina del extracto acuoso del *C. laurifolius* in Química e Industria 17(1): 112-3.

Ballesteros Moreno E., *et al.*, (1982) - Intoxicación por Cistáceas (Jaras) en pequeños rumiantes. Monografía de la Obra Cultural. Caja de Ahorro Provincial de Toledo.

Ballesteros Moreno E., *et al.*, (1983) - Terapéutica oral del síndrome convulsivo inducido por flavonoides del *C. laurifolius* in Comc. V Jorn. Tox. Esp. Madrid p. 127.

Barcaccia G., Lucchin M., Parrini P., (2000) - Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: i fondamenti metodologici. Sementi Elette 5: 5-15 .

Barlozzini B., Bruschi P., Sebastiani F., Grossoni P., (2011) – *Cistus laurifolius* L.: caratterizzazione molecolare e morfologica della popolazione di Santa Brigida (Pontassieve; FI) ai fini della sua conservazione. Atti Congresso Nazionale Società Botanica Italiana. Genova. 21-23. 09.2011. p. 148.

Barrajón-Catalán E., *et al.*, (2010) - Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells in Food & Chemical Toxicology 48: 2273-2282.

Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, Micol V., (2011) - A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. Phytochem Anal. 2011 Jul-Aug;22(4):303-12.

Bechi N., Corsi G., Pagni A.M., (1994) - On the glandular hairs of *Cistus laurifolius* L. (Cistaceae). Giornale Botanico Italiano, 128: 741-749.

Béguinot V., (1921) - Il *Cistus laurifolius* "ex Euganeis" nell'erbario di Giovanni Marsili. Bull. Società Botanica Italiana. 1921: 98-102.

Bernardino Da Ucria (Padre), (1789) – Hortus regius Panormitanus. Typis regiis. Panormi.

Berzi D., (2004) - Il fiore della Madonna: biodiversità tra storia e leggenda. Toscana l'Uomo, l'Ambiente, luglio/settembre 2004: 12. Nuova Toscana Editrice, Campi Bisenzio.

Bosch J., (1992) - Floral biology and pollinators of three co-occurring species (Cistaceae). Botanical Journal Linnean Society, 109: 39-55.

Bottacci A., (1989) – *Cistus laurifolius* L. Una specie minacciata. Natura e Montagna, 36 (3-4): 37-41.

Brandt U.G., Gottsberger, (1988) - Flower phenology, pollinating insects and breeding systems in *Cistus*, *Halimium*, and *Tuberaria* species in Portugal. *Lagascalia*15: (supplement) 625-634.

Bruno-Soares A., Sousa E., Abreu J.M., (1999) - Photosensitivity and toxicity occurrence in sheep at Alentejo Region. 1. An approach to the study of natural pastures-toxic plants. In: A.V. Portugal et al., (eds.), Proceed. VII Congr. Mediterranean Federation for Ruminant Health and Production. Santarém, Portugal, pp. 293-296.

Cepeda Fuentes J.M., (1991) – *Cistus laurifolius* L. (Cistaceae), nueva especie para la flora de Andalucía occidental. Anales Jardin Botanico de Madrid, 49(1): 139.

Chiti Batelli A., Fusi L., (2008) - Santa Brigida, Poggio Ripaghera, Valle dell'Inferno. Natura, storia, sentieri. Guida dell'Area Naturale Protetta di Interesse Locale. Comune di Pontassieve.

Comune Di Pontassieve, (2003) - Piano regolatore generale. Piano strutturale.

Comune Di Pontassieve, (2007) – Regolamento dell'Area Naturale Protetta di Interesse Locale "Poggio Ripaghera- Santa Brigida-Valle dell'Inferno" ex Legge Regionale 49/95 approvato con delibera C.C. n. 125 del 21/07/2000 e successivamente modificato con delibera C.C. n. 85 del 21/06/2001 con delibera C.C. n. 120 del 21/09/2001 e con delibera C.C. n. 93 del 25/09/2007.

Cockierham C., (1969) - Variance of gene frequencies. Evolution 23, 72-84.

Cockierham C., (1973) - Analyses of gene frequencies. Genetics 74, 679-700.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C., (2005) – An annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi Editore. Roma.

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., (1992) - Libro Rosso delle Piante d'Italia. WWF Italia, Società Botanica Italiana. Camerino.

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., (1997) - Liste rosse regionali delle piante d'Italia. WWF Italia, Società Botanica Italiana. Camerino.

Corner E.J.H., (1976) - The Seeds of Dicotyledons. Cambridge University Press, Cambridge, UK., pp: 311.

Corti R., (1959) - Specie rare o minacciate della flora mediterranea in Italia. Comptes Rendus Réunion Technique. Athènes U.I.C.N., 5: 112-129.

Dansereau P.M., (1939) - Monographie du genre *Cistus* L. Thèse de Doctorat. n° 1003. Conservatoire de Botanique. Genève.

De Andres A.I., *et al.*, (1999) - Effects of Extract of *C. populifolius* L. on the Central Nervous System in Phytotherapy Research 13(7) 575-9.

De Visiani R., Saccardo P.A., (1869) - Catalogo delle piante vascolari del Veneto. Ed. G. Antonelli. Venezia.

Demetzos C., Perdetzoglou, (1999) - Chemotaxonomic survey of wild and cultivated *Cistus* L. species. Plant Biosystem, 133: 251-254.

Demoly J.P., Montserrat P., (1993) - *Cistus*. In: S. Castroviejo *et al.*, (eds.), Flora Iberica. 3. Plumbaginaceae to Capparaceae. Real Jardín Botánico C.S.I.C. Madrid.

Edwards K.J., Barker J.H.A., Daly A., Jones C., Krap A., (1996) - Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. BioTechniques 20:758-760.

Ellul P. *et al.*, (2002) - Intra- and Interspecific Variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). Annals of Botany 90(3): 345-351.

Eriksson, Gösta., Inger Ekberg, David Clapham (2006) – An introduction to Forest Genetics, Second Edition. SLU Uppsala Sweden.

Excoffier, Laurent., Peter E. Smouse, Joseph M. Quattro (1992) – Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 131: 479-491.

Fiori A., (1927) - Nuova stazione di *Cistus laurifolius* L. nei dintorni di Firenze. N. Giorn. Bot. Ital. (Adunanza del giorno 12.3.1927), 34: 492.

Gardner M.F., Page R.G., (1997) – *Cistus* Linnaeus. In J. Cullen, J.C.M. Alexander, C.D. Brickell, K.R. Edmondson, P.S. Green, V.H. Heywood, P.M. Jørgensen, S.L. Jury, S.G. Knees, V.A. Matthews, H.S. Maxwell, D.M. Miller, E.C. Nelson, N.K.B. Robson, S.M. Walters, P.F. Yeo (eds.): The European Garden Flora. Vol. V. Cambridge University Press. Cambridge.

Gepts, P., (1993) – The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. In: M.K. Hecht (ed.), Evolutionary Biology. Vol. 27, pp. 51–94, Plenum Press, New York, USA.

González-Rabanal F., Casal M., (1995) - Effect of high temperatures and ash on germination of 10 species from gorse shrubland. *Vegetatio* 116: 123-131.

Grassi F., Labra M., Sala F., (2006) - Introduzione alla Biodiversità del mondo vegetale. Piccin.

Greuter W., Burdet H.M., Long G. (eds.), (1984) – *Cistus*. Med-Checklist. Vol. 1. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Genève.

Grosser W., (1903) - Cistaceae. Engler Pflanzenreich. 14 (IV - 193).

Grossoni P., Venturi E., (ined.) (2008) – Studio sulla conservazione di *Cistus laurifolius* L. nell’A.N.P.I.L. “Poggio Ripaghera - S. Brigida - Valle dell’Inferno” e sua divulgazione. Relazione per il Comune di Pontassieve.

Grossoni P., Venturi E., (2009) – Il Cisto laurino di Santa Brigida. Comune di Pontassieve.

Guzmán B., Vargas P., (2005) - Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* trnLtrnF, and matK sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 644-660.

Hamrick, J.L., Godt M.J.W., Sherman-Broyles S.L., (1992) – Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6:95–124.

Harris S.A., Ingram R., (1991) - Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40, 393-412.

Hartl D.L., Clark A.G., (1997) – Principles of population genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Herrera C.M., (1992) - Historical effects and sorting processes as explanations for contemporary ecological patterns: character syndromes in Mediterranean woody plants. *The American Naturalist* 140(3): 421-446.

Hewitt G.M., (2004) – The structure of biodiversity-insight from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1:4.

Hillis D.M., Bull. J.J., (1993) – An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192.

IUCN, (2004) - IUCN Red List. Categories and criteria. Version 3.1. <http://iucn.org/themes/ssc/red-lists.htm>.

Jarne P., Lagoda P.J.L., (1996) - Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11:424–429.

Jeanmonod D., Gamisans J., (2007) – Flora Corsica. Edisud. Aix-en-Provence.

Jewell, Erica, Andrew Robinson, David Savage, Tim Erwin, Christopher G. Love, Geraldine A. C. Lim, Xi Li, Jacqueline Batley, German C. Spangenberg, And David Edwards (2006) – SSRPrimer and SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery. W656–W659 *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, Web Server issue.

Kimura M., (1983) – The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, UK.

Kimura M., Crow J.F., (1964) – The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.

King R.A., Ferris C., Vainola R., Hewitt G.M., (1998) – Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, 80, 584–593.

Küpeli E., Yesilada E., (2007) - Flavonoids with anti-inflammatory & antinociceptive activity from *C. laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. of Ethnopharmacology*, 112: 524-530.

Leeb M., (2006) – *Cistus laurifolius* L. (Cistaceae). Indagine e proposte di conservazione. Tesi di laurea in Scienze Forestali e Ambientali. a.a. 2004-05. Università degli Studi di Firenze.

Lehman N., (1998) – Conservation biology: genes are not enough. *Curr. Biol.* 8:R722–R724.

Leite S.P., Vieira J.R., de Medeiros P.L., Leite R.M., de Menezes Lima V.L., Xavier H.S., de Oliveira Lima E., (2006) - Antimicrobial Activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 3(2):261-265.

Lewontin R.C., (1974) – The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press.

Lewontin R.C., Hubby J.L., (1966) - A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. II. Amount of Variation and Degree of Heterozygosity in Natural Populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.

Lombardi L., (ined.) (1997) – Area Naturale Protetta di Interesse Locale “Poggio Ripaghera – Santa Brigida”. Inquadramento vegetazionale. Comune di Pontassieve.

Lowe, Andrew., Stephen Harris e Paul Ashton (2004). *Ecological genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing.

Markova M., (1975) - Karyosystematische Untersuchungen an den Cistaceae Bulgariens. *Plant Syst. Evol.* 123: 283-315.

Martín Bolaños M., Guinea Lopez E., (1949) - Jarales y Jaras (Cistografia Hispanica), Min. Agr., Dir. gen montes, caza y pesca fluvial, Bol. Inst. For. Invest. y Exp. 20 (49), (228p.), Madrid.

Menghini L., Genovese S., Epifano F., Tirillini B., Ferrante C., Leporini L., (2010) - Antiproliferative, protective and antioxidant effects of artichoke, dandelion, turmeric and rosemary extracts and their formulation. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 23(2):601-610.

Milla R., Castro-Díez P., Maestro-Martinez M., Montserrat-Martí G., (2005) – Relationships between phenology and remobilization of nitrogen, phosphorus and potassium in branches of eight Mediterranean evergreens. *New Phytologist*, 168: 167-178.

Moggi G., Paoli P., Milletti N., (1984) – *Cistus laurifolius* L. In G. Gardini Peccenini (ed.) *Flora da proteggere. Indagine su alcune specie vegetali minacciate o rare in Italia*. Ed. ERREPIESSE. Pavia.

Molyneux P., (2004) - The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol*, 26,(2):211-219.

Monagas M., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Laureano O., Ricardo da Silva J.M., (2003) - Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem*, 51(22):6475-6481.

Mondino GP., Bernetti G., (1998) – I tipi forestali. Serie “Boschi e macchie di Toscana”. Edizioni Regione Toscana. Firenze.

Morelli I., (1981) - I principi attivi delle piante medicinali. Edizioni Edagricole, Bologna.

Morgante M., Olivieri A.M., (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.

Nandi O.I., (1998) - Floral development and systematic of Cistaceae. *Plant Systematics Evolution*, 212: 107-134.

Naviglio D., (2003) - Naviglio's Principle and presentation of an innovative solid-liquid extraction technology: Extractor Naviglio®. *Anal. Lett.* 36(8), 1647-1659.

Nei M., (1973) – Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 70:3321-3323.

Nei M., (1978) – Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Nei M., (1987) – *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.

Nei M., Li W.H., (1979) – Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 76: 5269-5273.

Ostrander E.A., Jong P.M., Rine J., Duyk G., (1992) – Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **89**: 3419-3423.

Palmé A.E., Vendramin G.G., (2002) - Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology*, 11, 9: 1769–1779.

Peakall R., Smouse P.E., (2005) – GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*.

Pearson K., (1895) - Contributions to the mathematical theory of evolution, II: Skew variation in homogeneous material. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 186: 343–414.

Pérez-García F., (1995) - Germinación de semillas de *C. osbeckiifolius* Webb ex Christ. (Cistaceae). *Botánica Macaronésica* 22: 25-34.

Petit R.M., *et al.*, (2002) - Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *For. Ecol. Manage.* 156: 5-26.

Petit R.J., Vendramin G.G., (2007) – Phylogeography of organelle DNA in plants: an introduction. In: Weiss S., Ferrand N., (eds.) *Phylogeography of Southern European Refugia*: 22-51. Springer.

Petit R.J., Aguinagalde I., De Beaulieu J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Lascoux M., Mohanty A., Muller-Strat G., Demesure-Musch B., Palme A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. (2003) – Glacial refugia: hotspots but not melting post of genetic diversity. *Science* 300:1563-1565.

Petit J.R., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D., Vendramin G.G., (2004) – Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations, *Molecular Ecology*, 10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x

Pignatti S., (1982) – *Flora d'Italia*. Edagricole. Bologna.

Piotto B., Di Noi A. (eds.), (2001) - *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA. Roma.

Powell W., Machray G.C., Provan, J., (1996) – Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.*, 1, 215–222.

Proctor M.C.F., (1955) - Some Chrom. counts in Eur. Cist. *Watsonia* 3: 154-9.

Pugliese A.M., Traini C., Cipriani S., Gianfriddo M., Mello T., Giovannini M.G., Galli A., Pedata F., (2009) - The adenosine A2A receptor antagonist ZM241385 enhances neuronal survival after oxygen-glucose deprivation in rat CA1 hippocampal slices. *Br J Pharmacol*, 157(5):818-830.

Reboud X., Zeyl C., (1994) - Organelle inheritance in plants. *Heredity*, 72:132–140.

Reed D.H., Frankham R., (2003) - Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology*, 17, 1, 230-237.

REpertorio NATuralistico TOscano (RENATO)
<http://web.rete.toscana.it/renato>; Regione Toscana, 2006.

Rizzotto M., (1979) - Ricerche tassonomiche e corologiche sulle Cistaceae. 1. Il genere *Cistus* in Italia. *Webbia*, 33(2): 343-378.

Rohlf F.J., Marcus L.F., (1993) - A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.*, 8: 129-132.

Rousset F., (1996) – Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142, 1357–1362.

Rozen S., Skaletsky H., (2000) – PRIMER 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S., MISENER, S. (eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Human Press, Totowa, NJ, USA: 365-386.

Sadhu S.K., Okuyama E., Fujimoto H., Ishibashi M., Yesilada E., (2006) - Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *J. of Ethnopharmacology*, 108: 371-378.

Sartini F., Mantovani M., (2003) - Guida botanica di Pontassieve. 1. La vegetazione spontanea. Comune di Pontassieve.

Savolainen V., *et al.*, (2000) - Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences. *Kew Bulletin* 55: 257-309.

Sharififar F., Mozaffarian V., Moradkhani S., (2007) - Comparison of antioxidant and free radical scavenging activities of the essential oils from flowers and fruits of *Otostegia persica* Boiss. *Pak J Biol Sci*, 10 (21):3895-3899.

Schuelke, Markus (2000) – An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *NATURE BIOTECHNOLOGY* VOL 18

Sebastiani F., Carnevale S., Vendramin G.G., (2004) - A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. *Molecular Ecology Notes*. 4: 259–261.

Simeray J., Chaumont J.P., Bevalot F., Vaguette J., (1982) - Les propriétés antifongiques des cistacées et plus particulièrement de *Cistus laurifolius* L.: rôle des tannins non hydrolysables. *Fitoterapia*, 53(1-2):45-48.

Slatkin M., (1987) - Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.

Slatkin M., (1995) - A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.

Sommier S., (1899) - Il *Cistus laurifolius* L. e il suo diritto di cittadinanza in Italia. *Bull. Società Botanica Italiana*, 61-64.

Sosa S., Bornancin A., Tubaro A., Della Loggia R., (2007) - Topical Antiinflammatory Activity of an Innovative Aqueous Formulation of Actichelated® Propolis vs Two Commercial Propolis Formulations. *Phytother Res*, 21:823-826.

Sposimo P., Lombardi L., Tarducci F., Castelli C., (Ined.) (1997) - Area Naturale Protetta di Interesse Locale "Poggio Ripaghera - Santa Brigida". Indirizzi gestionali per le aree forestali e per le cenosi erbacee. Comune di Pontassieve.

Talavera S., Gibbs P.E., Herrera J., (1993) - Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Systematics & Evolution* 186(3-4): 123-134 illus.

Taliani A., (a.a. 2008-2009) - Proprietà antinfiammatorie dei principali polifenoli ottenuti dalle acque di vegetazione dell'olio di oliva. Tesi di laurea in Farmacia, Università di Siena

Tárrega R., Luis-Calabuig E., Alonso I., (1997) - Space-time heterogeneity in the recovery after experimental burning and cutting in a *Cistus laurifolius* shrubland. *Plant Ecology*, 129: 179-187.

Tautz D., (1989) - Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17, 6463-6471.

Thanos C.A., Georghiou K., (1988) - Ecophysiology of fire stimulated seed germination in *Cistus incanus* ssp. creticus (L.) and *C. salviifolius* (L.). *Plant Cell Environment*, 11: 841-849.

The *Cistus* & *Halimium* Website -www.cistuspage.org.uk

Thompson J.D., Lavergne S., Affre L., Gaudeul M., Debussche M. (2005) – Ecological differentiation of Mediterranean endemic plants. *Taxon*, 54: 967–976.

Trevisan V., (1842) - Prospetto della Flora Euganea. Padova.

Ustün O., Özçelik B., Akyön Y., Abbasoglu U., Yesilada E., (2006) - Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *C. laurifolius* leaves. *J. of Ethnopharmacology*, 108: 457-461.

Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B., (1993) – Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133:737-749.

Vendramin G.G., Ziegenhagen B., (1997) - Characterization and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome* 40 : 857-864.

Vannuccini M., (ined.) (2011) - Piano di Gestione delle formazioni vegetali (attuazione art. 10 Regolamento A.N.P.I.L. “Santa Brigida-Poggio Ripaghera-Valle dell’Inferno”). Relazione per il Comune di Pontassieve.

Viciani D., (ined.) (2008) - Parco culturale di M. Giovi. Gli aspetti floristico-vegetazionali. Comune di Pontassieve.

Vogt T., Proksch P., Gülz P.G. (1987) - Epicuticular flavonoid aglycones in the genus *Cistus*, (Cistaceae). *Z Pflanzenphysiol* 131: 25- 36.

Vogt T., Gülz P.G., (1994) - Accumulation of flavonoids during leaf development in *Cistus laurifolius*. *Phytochemistry*, 36: 591-597.

Warburg E.F., (1968) - *Cistus*. In T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb. (eds.): *Flora Europaea*. 2. Cambridge University Press. Cambridge.

Weising K., Gardner R.C., (1998) – A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.

Wolfe K., H., Li H.W.-H, Sharp P. M., (1987) - Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9054-9058.

Wright S., (1965) – The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Yeh F.C., Boyle T.J.B., (1997) – Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.

Yesilada E., Gürbüz I., Ergun E., (1997)a - Effects of *C. laurifolius* L. flowers on gastric & duodenal lesions. *J. of Ethnopharmacology*, 55: 201-211.

Yesilada E., Ustün O., Sezik E., Takaishi Y., Ono Y., Honda G., (1997)b - Inibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1alpha, interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J. of Ethnopharmacology*, 58: 59-73.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Comune di Pontassieve per i due finanziamenti per la ricerca erogati al Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Firenze e per le autorizzazioni concesse per il prelievo del materiale per la ricerca.

Un ringraziamento va al prof. Paolo Grossoni e al Dott. Piero Bruschi che hanno creduto in me e mi hanno offerto l'opportunità di intraprendere e portare a termine il Dottorato di ricerca.

La raccolta degli esemplari spagnoli è stata possibile solo grazie all'aiuto del Dott. Pablo Manzano Baena, ricercatore presso l'Università Autonoma di Madrid e al Dott. Sergio Velasco Ayuso ricercatore presso l'Università di Granada.

Ringrazio il Dott. Federico Sebastiani che con la sua pazienza mi ha fatto da maestro insegnandomi scrupolosamente le metodiche di lavoro permettendomi di portare a termine la parte di analisi molecolare. Insieme a lui voglio ringraziare anche la Dott.ssa Francesca Pinzauti e la Dott.ssa Sara Torre che sono stata anch'esse un prezioso supporto.

Per le analisi fitochimiche ringrazio invece il Dott. Marco Michelozzi e Gabriele Cencetti (CNR-IGV, Sesto Fiorentino) oltre al sempre disponibile Prof. Luca Calamai (DiPSA-Unifi).

Un ringraziamento particolare va anche all'Unità Operativa di Biologia farmaceutica dell'Università di Siena, alla Prof.ssa Daniela Giachetti che mi ha dato l'opportunità di approfondire le conoscenze riguardo la fitoterapia. Insieme con lei ringrazio il Dott. Marco Biagi che in questi tre anni mi ha introdotto nel laboratorio trasmettendomi metodiche e conoscenze e aiutandomi per le analisi fitochimiche e per i *test in vitro* insieme alla Dott.ssa Daniela Manca, alla Prof.ssa Elisabetta Miraldi, alla Dott.ssa Anna Rosa Magnano, al Dott. Claudio Mannari.