



AZIONE A.1

REPORT

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DELLE POPOLAZIONI DI *CALENDULA MARITIMA* GUSS.

Data di Rilascio: 16/01/2019

a cura di

Giuseppe Garfi
Alessandro Silvestre Gristina
Francesco Mercati
Salvatore Pasta

CNR-IBBR PALERMO

Indice

Introduzione	1
Materiali e Metodi	2
Campionamento del materiale vegetale	2
RNA-Sequencing e identificazione dei marcatori molecolari microsatelliti (SSR) specifici	3
Risultati	4
Conclusioni	6
Bibliografia di riferimento	7

Introduzione

Calendula maritima Guss. è una specie erbacea annuale o perenne a ciclo vitale breve a seconda della disponibilità idrica e dell'intensità e durata dello stress idrico estivo. Essa svolge un ruolo-chiave nel funzionamento di diversi ecosistemi costieri, di cui determina anche la fisionomia. Adattata a vivere sia in contesti rocciosi con suoli molto primitivi ed esigui, dove partecipa alle comunità litofile aeroaline riferite alla classe *Crithmo-Limonietea* e agli arbusteti a chenopodiacee alo-xerofile riferiti alla classe *Sarcocornietea fruticosae*, essa si riscontra anche all'interno di consorzi tipici delle dune più o meno evolute (classi *Ammophiletea australis* e *Helichryso-Crucianelletea*). Grazie alla notevole tolleranza allo stress idrico ed edafico ed ad una notevole resilienza al disturbo antropico, essa partecipa a comunità marcatamente nitrofile e ruderali riferibili alla classe *Stellarietea mediae* interessate da un continuo apporto di nutrienti organici (resti spiaggiati di fanerogame marine e macroalghe, deiezioni e scarti alimentari in prossimità di colonie di uccelli marini, ecc.), contribuendo in maniera importante alla biodiversità complessiva degli ecosistemi costieri (foto 1).



Foto 1 Esempari di *Calendula maritima* nell'ambiente retrodunale del sito di Cavallino Bianco (TP)

Nonostante la notevole ampiezza ecologica e l'adattabilità ad ambienti disturbati, *Calendula maritima* presenta una distribuzione molto discontinua. Infatti, il suo areale ha subito una forte regressione nel corso degli ultimi 150 anni, perlopiù a causa della frammentazione degli habitat idonei, dovuta a sua volta all'intensa pressione antropica. In conformità con i criteri di classificazione stabiliti dalla IUCN, *Calendula maritima* è considerata come "CR" (= gravemente minacciata) ed è inclusa fra le 50 specie di piante più gravemente minacciate delle isole del Mediterraneo (Pasta et al 2017).

Studi recenti (Plume et al 2015) hanno evidenziato come l'ibridazione con una specie congenere, *Calendula fulgida* Raf., costituisca una seria minaccia per le prospettive di sopravvivenza di questa specie a rischio. Per mitigare questa minaccia il progetto LIFE15NAT/IT/000914 CalMarSi ha previsto - nell'ambito dell'azione A1 "Inventario georiferito e caratterizzazione delle popolazioni attuali

(*distribuzione, demografia, diversità genetica*)” – la caratterizzazione genetica di tutte le popolazioni note per valutare la diversità inter- ed intra-popolazionale della specie e l'entità del fenomeno di ibridazione con *Calendula fulgida*, mediante lo sviluppo di marcatori molecolari specie-specifici con tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS – Next Generation Sequencing). L'azione di caratterizzazione genetica è stata propedeutica alla scelta dei popolamenti a maggiore grado di purezza da cui raccogliere e moltiplicare, attraverso tecniche di propagazione *in vitro*, il materiale per le successive azioni mirate al rafforzamento di alcune delle popolazioni più depauperate ed alla creazione di nuove popolazioni (*species translocation*).

Materiali e Metodi

Campionamento del materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato per gli esperimenti di RNA-sequencing e caratterizzazione genetica mediante microsatelliti (SSR - Simple Sequence Repeat) è stato raccolto in tutte le popolazioni naturali prelevando 4 foglie da ciascun individuo.

Il campionamento random è stato effettuato lungo tutta l'area di distribuzione di ciascuna popolazione in modo da evitare di campionare individui strettamente imparentati e includendo volontariamente, nelle popolazioni ove è stato possibile identificarli in maniera macroscopica, uno o più individui fenotipicamente putativi ibridi. Sono stati considerati putativi ibridi quegli individui che presentavano al momento della fioritura una colorazione del fiore arancione, diversa da quella tipica della specie di interesse che solitamente è gialla, portamento piuttosto eretto, foglie cauline vistosamente crenate e scarsa aromaticità delle foglie allo strofinamento, carattere che invece è tipico di *Calendula maritima*.

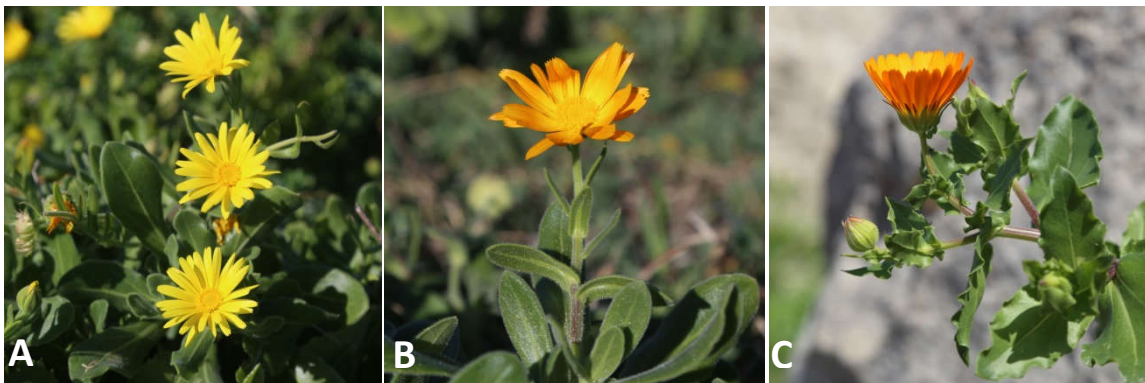


Foto 2 - a) esemplare di *Calendula maritima* puro; b) esemplare ibrido c) esemplare di *Calendula fulgida* puro

Sono state campionate, etichettate e georeferenziate 252 piante di *Calendula maritima* e putativi ibridi prelevate nei 15 popolamenti rinvenuti (Tab. 1). Non è stato possibile campionare solo il popolamento dell'Isola di Formica, già noto dalla letteratura, per l'impossibilità di ottenere il permesso di sbarco sull'isola, il cui accesso è normalmente interdetto al pubblico poiché l'isola ospita una comunità di recupero per tossicodipendenti. Per ogni individuo sono stati registrati anche i principali caratteri

morfologici-fenologici distintivi, quali il colore del fiore, il portamento della pianta, le caratteristiche del margine fogliare e l'aromaticità della pianta. Per valutare il grado di ibridazione delle popolazioni di *C. maritima* sono stati inclusi nelle analisi 32 individui di *C. fulgida* da utilizzare come *outgroup* nelle analisi genetiche (Tab. 2): 10 sono stati campionati a Monte Cofano (TP) da una popolazione ritenuta geneticamente pura; 20 provengono da 10 popolazioni a diverso grado di purezza all'interno dell'areale di *C. maritima*, valutato sulla base dei caratteri fenotipici e della distanza geografica dal popolamento più vicino di *C. maritima*; infine 2 sono stati raccolti a Monte Pellegrino (PA), lontano dall'areale di *C. maritima*.

RNA-Sequencing e identificazione dei marcatori molecolari microsatelliti (SSR) specie specifici

Poiché in letteratura non esistono marcatori molecolari specifici per *C. maritima*, è stato ricostruito *de novo* il trascrittoma (la parte trascritta del DNA) delle due specie, *C. maritima* e *C. fulgida* attraverso tecniche di NGS, in particolare utilizzando l'RNA sequencing (RNASeq). Attraverso analisi bioinformatiche, confrontando i due trascrittomi è stato possibile identificare più di 200 marcatori SSR polimorfici tra le specie. La successiva standardizzazione e validazione in PCR dei marcatori isolati ha permesso di selezionare un set di 33 marcatori. Verificata la capacità di discriminare *C. maritima* e *C. fulgida* su un primo gruppo di 32 campioni equamente suddivisi tra le due specie, i 19 marcatori maggiormente informativi sono stati selezionati ed utilizzati per la caratterizzazione genetica di tutte le popolazioni oggetto di studio.

Tabella 1 – Popolazioni di *Calendula maritima* campionate

Località	Codice popolazione	N° campioni per analisi genetiche	Compresenza di <i>C. fulgida</i>
Isola Lunga	IL	15	no
Isola Maraone	MA	21	no
Bingo	BIN	10	sì
Lungomare Alighieri West	LAW	10	no
Mulino	MUL	15	no
S. Cusimano Castiglione	S-CUS-C	20	no
S. Cusimano Nord	S-CUS-N	16	sì
Pizzolungo	PZL	20	sì
San Liberale	S-LIB	5	no
Cavallino Bianco	CAVB	20	no
Torrente Bajata	TBN	20	no
Isola Colombaia	COL	20	no
Ronciglio	RON	20	no
Tonnara S. Giuliano	S-GIU	20	no
Villino nasi	NAS	20	no
Isola Formica	FOR	0	no

Tabella 2 - Popolazioni campionate riferibili a *Calendula fulgida*

<i>Località</i>	<i>Codice popolazione</i>	<i>N° campioni per analisi genetiche</i>
Tonnara di Monte Cofano	COF	10
Simply	SIM	2
Cavallino bianco	CAVB	2
Bingo	BIN	2
San Cusumano Nord	S-CUS-N	2
Pizzolungo A	PZL	2
Pizzolungo B	PZL	2
Benzinaio	BENZ	2
Bonagia	BON	2
Cornino A	CORN	2
Cornino B	CORN	2
Monte Pellegrino	PEL	2

Risultati

L'analisi dei dati genetici ottenuti ha permesso di identificare un microsatellite (SSR236) con alleli specie-specifici per *C. maritima* e *C. fulgida*. Nella fattispecie, per quanto riguarda *C. fulgida* sono stati individuati gli alleli 125 e 130, il primo presente soltanto nella popolazione di Monte Pellegrino ma non in quelle di Trapani; le popolazioni di *C. maritima* mostrano invece solo gli alleli 140 e 135, quest'ultimo presente soltanto in 5 dei 15 popolamenti e nel 4% di tutte le piante analizzate. Insieme agli altri, il marcatore SSR236 ha permesso di discriminare con estrema precisione l'identità genetica degli individui da riferire univocamente ad ognuna delle due specie e di identificare la maggior parte delle putative piante ibride (Fig. 1). Sono state così individuate, rispettivamente di *C. maritima* e *C. fulgida*, 224 e 18 piante pure, mentre le rimanenti sono risultate ibridi fra le due specie.

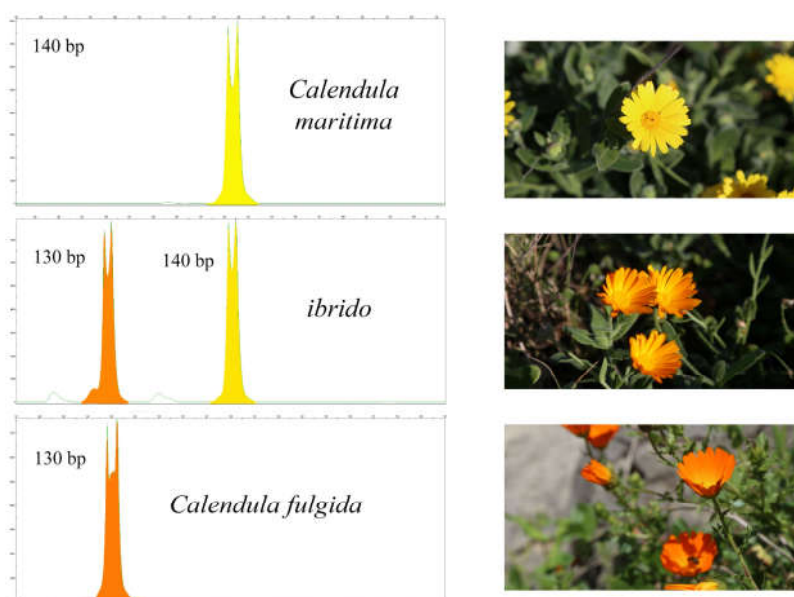


Fig. 1. Esempio di ferogrammi ottenuti con il microsatellite SSR236 su esemplari rispettivamente di *C. maritima*, ibrido e *C. fulgida*

Va sottolineato che incrociando i dati genetici con quelli morfologici, circa il 50% degli individui campionati come “ibridi” su basi fenotipiche per la presenza di caratteri intermedi tra le due specie, sono stati effettivamente confermati tali in base al profilo genetico. Ma ciò che è più interessante ai fini delle azioni di conservazione previste dal progetto, il confronto tra i dati morfologici e quelli molecolari ha permesso anche di identificare come ibridi alcuni individui la cui morfologia non lasciava presupporre chiaramente la loro origine ibrida. Più precisamente, 13 piante sono risultate ibride dal punto di vista molecolare, benché mostrassero un fenotipo ‘tipico’ di *C. maritima*, 3 piante avevano caratteri morfologici riferibili ad ibridi ma profilo genetico tipico di *C. maritima*, mentre 2 piante con fenotipo di *C. maritima* hanno mostrato un profilo genetico di *C. fulgida* (Fig. 2).

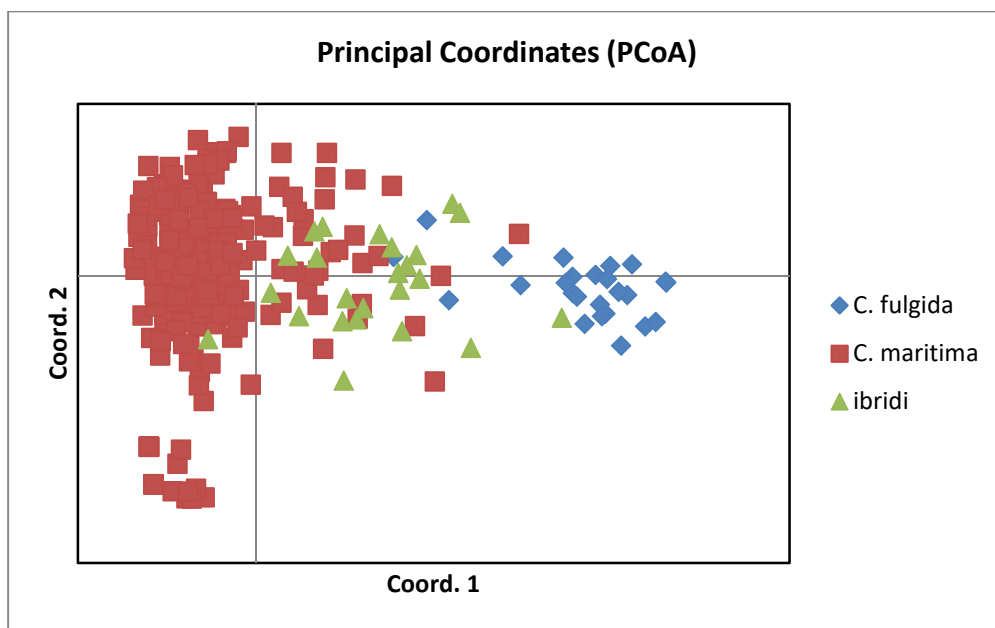


Fig. 2. Distribuzione dei 284 individui di *Calendula maritima*, *C. fulgida* e degli ibridi in funzione della distanza genetica

Per quanto riguarda le singole popolazioni, 10 su 15 (IL, MA, TBN, COL, RON, NAS, S-LIB, LAW, S-GIU, MUL) mostrano un buon grado di purezza genetica. Sulla base di tali risultati si può escludere che le piante campionate da tali popolazioni derivino da processi di ibridazione tra le due specie e pertanto possono essere considerate idonee per il prelievo di materiale da propagare *in-vitro*. Inoltre, alla luce dei buoni livelli di diversità genetica intra-popolazionale ancora conservati, fatta eccezione per la popolazione dell'isola di Colombaia che è risultata molto omogenea, per il momento appare scongiurato il rischio di un crollo della diversità genetica complessiva della specie a causa dei processi di *inbreeding* in corso.

Per le restanti 5 popolazioni (BIN, CAVB, S-CUS-C, S-CUS-N e PZL) i processi di ibridazione già evidenziati su base morfologica sono stati confermati su base molecolare, pertanto tali popolazioni non verranno prese in considerazione per la raccolta del materiale da propagare *in-vitro*.

I risultati ottenuti confermano quanto già segnalato da Plume et al. (2015) a proposito dell'esistenza di processi di ibridazione tra le due specie. Dai livelli di introgressione riscontrati si evince che il processo è in continua evoluzione e da tenere sotto controllo poiché potrebbe minacciare gravemente la sopravvivenza di *C. maritima* in seguito all'insorgere di fenomeni di depressione da *outbreeding*.

Conclusioni

Il risultato più importante e confortante dell'indagine genetica effettuata appare l'individuazione di diverse popolazioni che possono essere ritenute interamente costituite da individui di *Calendula maritima* geneticamente puri. Tale risultato ha due importanti ricadute sulle scelte da operare sotto il profilo della conservazione *in situ* della specie: a) l'applicazione di misure di salvaguardia più restrittive per le popolazioni pure, al fine di preservare l'integrità genetica dei popolamenti e l'integrità e funzionalità degli ecosistemi che li ospitano; b) l'utilizzo di tali popolazioni come fonte di materiale di propagazione per le attività di rafforzamento, il restauro ed il ripristino di popolamenti storici e la diffusione della specie in nuovi siti.

Bibliografia di riferimento

- Di Martino A. & Perrone C., 1970. Flora delle Isole dello Stagnone (Marsala) — Lav. Ist. Bot. Giard. Colon. Palermo, 24: 109-166.
- Di Martino A. & Trapani S., 1967. Flora e vegetazione delle isole di Favignana e Levanzo nell'Arcipelago delle Egadi— Lav. Ist. Bot. Giard. Colon. Palermo, 22: 122-228.
- Grammatico F., 2011. Aggiornamenti sulla distribuzione e status di conservazione di *Calendula maritima* Guss. (Asteraceae) Naturalista sicil., s.4, 35(1):43-49.
- Grammatico F. & Fici S., 2008. Distribuzione, fenologia e status di conservazione di *Calendula suffruticosa* Vahl subsp. *maritima* (Guss.) Meikle (Asteraceae). Naturalista sicil., s. 4, 32(3-4):305-318.
- Gussone G., 1843-1844. Florae Siculae Synopsis exhiben splantas vasculares in Sicilia insulisque adjacentibus hucusque detectas secundum systema Linneanum dispositas. Neapoli, Typ. Tramater, 2 (1):1-526 + iii pp.
- Pasta S., Garfi G., Carimi F., Marcenò C., 2017. Human disturbance, habitat degradation and niche shift: the case of the endemic *Calendula maritima* Guss. (W Sicily, Italy). Rendiconti Lincei, 28(2): 415-424.
- Pasta S., Troia A., Garfi G., 2017. *Calendula maritima*. In: Pasta S., Perez-Graber A., Fazan L., Montmollin B. (de) (eds.), 2017. The Top 50 Mediterranean Island Plants UPDATE 2017. IUCN/SSC/Mediterranean Plant Specialist Group. Neuchâtel (Switzerland) (<http://top50.iucn-mpsg.org>).
- Perrone C., 1964. Una nuova stazione di *Calendula officinalis* L. var. *maritima* (Guss.) e la sua distribuzione geografica. Lav. Ist. Bot. Giard. Colon. Palermo, 20:276-284.
- Plume O., Troia A., Raimondo F.M., 2015. Hybridization and competition between the endangered sea marigold (*Calendula maritima*, Asteraceae) and a more common congener. Plant Biosyst., 149:68-77.
- Ponzo A., 1905. La flora psammofila del litorale di Trapani. Naturalista sicil., ser. 2, 12(7-8): 173-177; *ibidem*, 12(9):201-208; *ibidem*, 12(10): 230-237.
- Raimondo F.M., Bazan G., Troia A., 2011. Taxa a rischio nella flora vascolare della Sicilia. Biogeografia, 30:229-239.
- Troia A., 2012. Revised lectotypification of the name *Calendula maritima* (Asteraceae). Phytotaxa, 71: 48-51.
- Troia A., 2011. Strategie di gestione delle popolazioni di *Calendula maritima* Guss. (Asteraceae). Naturalista sicil., 35(1):51-63.
- Troia A., Pasta S., 2006. *Calendula maritima*. The IUCN red list of threatened species 2006: e.T61618A12524417. Accessed 02 Jan 2018