

## Sistematica, morfologia, ecologia ed erbari

### *Le diverse chiavi di lettura di un erbario*

Molteplici sono le informazioni desumibili dai campioni di un erbario: i caratteri espliciti, che sono facilmente osservabili da tutti (colori, forme, dimensioni, descrizioni) e quelli impliciti o nascosti, che necessitano di sofisticate tecnologie per essere apprezzati (struttura delle cellule e dei pollini, numero e forma dei cromosomi, sequenze genomiche). Queste indicazioni, offrono ulteriori e più approfondite possibilità di applicazione, che vanno ben oltre il semplice e scontato ruolo didattico-divulgativo, ne determinano una grande versatilità e lo rendono una solida base per lo sviluppo di svariate ricerche scientifiche.

Nella prima parte di questa trattazione saranno esaminati i principali ruoli assolti dagli erbari nel campo della biologia vegetale. Nella seconda parte viene proposto un esempio applicativo di differenti metodologie scientifiche basate su materiali d'erbario per la definizione tassonomica di un gruppo critico della flora italiana. Tale caso costituisce parte dell'attività di ricerca dall'autore, svolta nel corso di Dottorato di Ricerca presso l'Università Politecnica delle Marche.

Il vantaggio di condurre ricerche sui materiali d'erbario è rappresentato dalla possibilità di avere accesso ad una grande quantità di *exsiccata* derivanti dalle collezioni di più botanici, effettuate in tempi e luoghi differenti. Tale disponibilità può essere inoltre accresciuta ricorrendo allo scambio di campioni, una pratica già nota a Linneo (1707-1778) per incrementare e migliorare la descrizione delle proprie specie.

Le informazioni ottenibili da un erbario possono essere distinte in due categorie: quelle di tipo biologico, apportate dallo studio del campione vegetale e quelle di tipo didattico, desumibili dai dati riportati nel cartellino o etichetta dell'erbario stesso, che accompagna ciascun *exsiccatum* e ne rappresenta la carta d'identità (Fig 1 scansione campione+cartellino).

Le indagini biologiche, che possono essere condotte sui campioni vegetali, sono numerose e rivestono una grande importanza in campo tassonomico e floristico, rivelandosi particolarmente utili negli studi morfologici, anatomici, palinologici, fenologici, fitochimici, cariologici (Valdés, 1993) e nel più recente campo molecolare. Grazie alle differenti modalità di evoluzione del genoma è infatti possibile ricostruire la storia evolutiva degli individui, a partire dai tempi più remoti fino a quelli più recenti (Brown, 1983; Pace *et al.*, 1986).

Di diversa natura sono le informazioni didattiche, desunte dal cartellino d'erbario, che documentano la storia di ciascuna accessione sulla base delle descrizioni annotate al momento della raccolta. Ogni etichetta contiene notizie relative al codice nomenclaturale, ai raccoglitori (*legit*), ai determinatori (*determinavit*), ad eventuali revisori (*revidit*) della specie ed ai dati stazionali del sito di raccolta (caratteristiche vegetazionali, ecologiche, podologiche, litologiche, topologiche, geografiche, etnobotaniche, ecc.). L'accuratezza e la bontà delle annotazioni in questa fase risultano essere particolarmente importanti ai fini conoscitivi e descrittivi dell'ecologia del singolo *taxon*.

### *Applicazioni scientifiche con gli erbari*

Le applicazioni scientifiche che si avvalgono del supporto degli erbari, intesi nella loro accezione più ampia, sono numerose e spesso il loro risultato finale è frutto del contributo congiunto di entrambi i canali informativi.

Numerose revisioni sistematiche di gruppi critici sono state condotte sulla scorta della comparazione dei materiali provenienti dai principali erbari italiani, come per il genere *Amarantus* (Lorenzoni e Ziliotto, 1967), mentre in altri casi, ci si è avvalsi dello studio dei caratteri microscopici (sezioni fogliari) per stabilire i criteri della determinazione tassonomica dei generi *Puccinellia* e *Glyceria* (Lorenzoni, 1967).

Le ricerche sistematiche possono avere anche risvolti storici, conducendo allo studio delle collezioni più antiche e alla ricerca dei *loci classici* e di tipi negli erbari (Vescovo *et al.*, 1987). Le indagini tassonomiche possono essere, a loro volta, correlate a matrici fitogeografiche e storiche, con lo scopo di verificare il grado di omogeneità del numero di campioni raccolti per genere e famiglia, di esaminare gli aspetti distributivi, di identificarne i centri di raccolta e di confrontare le rilevazioni numeriche con le reali diffusioni riportate in bibliografia (Colasante, 1983; Cucchini e Pieroni, 1998).

Dal punto di vista fitogeografico, gli *exsiccata* possono essere impiegati non solo per censire un genere di cui interessa definire l'areale di distribuzione (Amadori e Gigli, 1986), ma anche per studiare i processi invasivi di specie alloctone e per documentarne periodo e luogo di diffusione (Stadler *et al.*, 1998; Delisle *et al.*, 2003).

Come è noto, le piante rappresentano dei validi indicatori ambientali, per cui gli esemplari d'erbario potrebbero testimoniare la presenza di particolari biotopi attualmente scomparsi per differenti cause, spesso di natura antropica. Pertanto, durante lo studio botanico di una determinata area, l'esame preliminare dei campioni collezionati per quel sito potrebbe fornire maggiori delucidazioni sulla conoscenza della composizione floristica: potrebbero emergere testimonianze di coltivazioni ormai abbandonate (ad esempio quella del riso nella pianura padana), di specie erbacee legate a quella coltura (ad esempio *Caltha*), di piante introdotte per effettuare rinverdimenti, di una vegetazione scomparsa (come quella alofila), legata a particolari condizioni edafo-climatiche (Bertolani, 1993). Le collezioni botaniche permettono di monitorare anche i cambiamenti ambientali, ad esempio attraverso lo studio delle anomalie fenologiche, dello stato qualitativo delle cere epicutcolari e della densità stomatica (Gellini e Paoletti, 1993).

Dal punto di vista prettamente storeografico, gli erbari rappresentano dei validi documenti per ricostruire la vita dei diversi autori, i loro viaggi e spedizioni, le metodologie scientifiche adoperate, l'appartenenza a determinate correnti di pensiero botanico (Gonzalez, 1993).

Di notevole entità, infine, è il contributo apportato dai campioni vegetali essiccati per gli studi molecolari, i quali, basandosi su tecniche non distruttive, necessitano di pochi quantitativi di materiale vegetale (generalmente foglie) per l'estrazione del DNA senza il rischio di compromettere l'integrità del campione.

Occorre notare che gli studi molecolari hanno tra i principali scopi la ricostruzione della storia evolutiva di un gruppo di organismi, avvalendosi anche del contributo fornito dai metodi morfologici. Nonostante inizialmente fossero sorti dei problemi riguardo alla compatibilità dei due approcci, oggi vengono spesso applicati in modo integrato (Hillis, 1987).

L'attuale linea di tendenza vede, inoltre, l'impiego delle suddette indagini a supporto di altri studi, come quelli morfologici, biogeografici ed ecologici.

Le collezioni dei campioni d'erbario integrate, quando necessario, con campioni freschi, costituiscono la base di partenza per lo sviluppo di ricerche molecolari inerenti revisioni tassonomiche, studi evolutivi e filogenetici, indagini sui fenomeni di ibridizzazione e di formazione di nuovi *taxa*, ricerche sulla distribuzione geografica ed ecologica, confronti ed osservazioni con i sistemi di classificazione tradizionale su base morfologica (Yuan e Küpfer, 1995; Allan e Porter, 2000; Marhold *et al.*, 2002; Stappen *et al.*, 2002; Fici e Lo Presti, 2003; Li-Bing e Joachim, 2004; Per *et al.*, 2005; Shipunov *et al.*, 2005; Wissemann e Ritz, 2005; Marcussen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006).

Il contenuto informativo e la rappresentatività di un erbario possono essere, tuttavia, influenzati da diversi fattori: la completezza degli esemplari raccolti, il ridotto numero di campioni (sia per l'intera collezione o soltanto per alcuni generi o famiglie), l'uniformità delle collezioni (intesa come bassa variabilità dei caratteri morfologici e limitata estensione dell'areale di raccolta), lo stato di conservazione (perdita o distruzione di parti del campione per attacchi parassitari, muffe o rimaneggiamenti), progressiva depauperazione a causa dell'utilizzazione incontrollata (Valdés, 1993).

Particolari attenzioni e cure, dunque, devono essere riposte nelle fasi di raccolta dei dati e nella successiva compilazione del cartellino. Soltanto in questa maniera sarà possibile costruire per ciascun *taxa* un profilo ecologico pertinente alla realtà, che monitori la sua distribuzione, e permetta di determinare a quali fattori biologici, ambientali, climatici, pedologici esso è legato.

### *Il caso di studio del gruppo Anthyllis vulneraria L.*

Al fine di meglio chiarire la funzione scientifica e le molteplici chiavi di lettura di un erbario, viene proposta un'esperienza di ricerca finalizzata alla definizione della tassonomia del gruppo sottospecifico *Anthyllis vulneraria* L., che ha fondato le sue indagini proprio su campioni essiccati e informazioni didascaliche dei cartellini (Fig. 2 – foto *Anthyllis*).

E' questa una specie estremamente polimorfa, dove popolazioni scarsamente distinte possono essere collegate da popolazioni intermedie, che ne rendono difficile una separazione netta, tanto da poter essere considerata come un'unica specie (Pignatti, 1961).

Lo scopo dell'indagine è stato quello di fornire un contributo alla definizione tassonomica e alla caratterizzazione delle popolazioni di *Anthyllis vulneraria* subsp. rinvenibili nell'Appennino centrale (Fig. 3- monte cucco).

Per l'area indagata sono stati studiati i *taxa* più frequenti e comuni: *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *polyphylla* (DC.) Nyman; *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *praepropera* (Kerner) Bornm. (= subsp. *rubriflora* [DC.] Arcangeli); *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *pulchella* (Vis.) Bornm; *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *weldeniana* (Rchb.) Cullen. In aggiunta sono stati esaminati altri *taxa* meno comuni e di differente provenienza geografica: *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *vulneraria*; *Anthyllis vulneraria* L. subsp. *maura* (Beck) Linbd.; *taxa* di dubbia attribuzione provenienti dai Monti della Laga; *taxa* di origine baltica.

Lo studio è stato svolto secondo differenti approcci:

- Valutazione delle caratteristiche ecologiche
- Valutazione dei caratteri morfologici
- Valutazione degli aspetti molecolari

### Indagine ecologica

L'indagine ecologica è stata sviluppata sulla base delle descrizioni effettuate dai raccoglitori circa le caratteristiche stazionali del sito di raccolta dell'accessione e annotate negli appositi cartellini d'erbario. Grazie all'accurata e scrupolosa raccolta di dati e alla loro informatizzazione, è stato possibile tracciare una sorta di quadro ecologico per ogni sottospecie.

Le notizie sono state desunte dai cartellini delle accessioni depositate presso l'*Herbarium Anconitanum* (ANC) dell'Università Politecnica delle Marche e l'*Herbarium Brillii-Cattarini De Planta-Salis*, del Centro Ricerche Floristiche Marche (PS). L'intero set è rappresentato da circa 950 accessioni provenienti da 70 differenti località, distribuite tra Marche, Umbria e Abruzzo.

Da ciascun cartellino sono state estratte le seguenti categorie interpretative: habitat (Fig. 4- popolamento), presenza di humus, litotipo, esposizione, piano altitudinale. Per ciascuna macro-categoria sono state successivamente estrapolate ulteriori informazioni (Tab. 1).

La fase maggiormente laboriosa di tale processo di classificazione è consistita nell'estrazione delle singole unità informative all'interno del database d'erbario. L'inserimento dei dati senza il rispetto di una struttura organizzata in classi di argomenti produce un contenuto unicamente descrittivo, che mal si presta ad essere classificato ed ordinato, in quanto le singole informazioni sono raggruppate insieme in un'unica stringa. Ne deriva l'importanza di strutturare, invece, un cartellino il più dettagliato possibile, che preveda un numero elevato di voci e di inserimenti, al fine di scomporre tutti i dati a disposizione in unità minime di informazione. In questa maniera risulterà molto più

agevole realizzare un processo di elaborazione qualitativa e quantitativa delle indicazioni, in quanto già strutturate per poter essere classificate secondo determinate categorie.

Tab. 1 – Categorie informative estratte dai cartellini d'erbario

Habitat	Humus	Litotipo	Esposizione	Piani altitudinali
pascoli	humus abbondante	arenarie e peliti	n	piano basso collinare
pascoli aperti	humus medio	arenarie	ne	piano alto collinare
praterie	humus scarso	marne ed arenarie	e	piano basso montano
praterie aperte	humus nullo	calcarei	se	piano alto montano
prati-pascolo	-	-	s	piano subalpino
boschi	-	-	so	piano alpino
ambienti di margine	-	-	o	-
ambienti rupestri	-	-	no	-
coltivi abbandonati	-	-	-	-

Dall'analisi dei dati sono state ottenute le classi di frequenza di ciascun *taxon* per ogni parametro indagato. I risultati sono stati rappresentati mediante dei grafici a ragnatela, utili per confrontare valori aggregati di più serie di dati (Fig. 5).

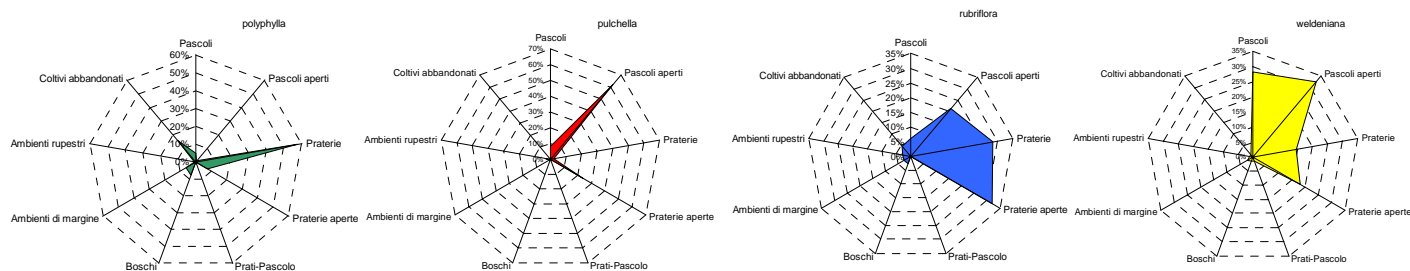


Fig. 5 - Distribuzione di *A. v. subsp.* nei differenti habitat indagati dalle indagini d'erbario

### Indagine morfologica

L'altro approccio utilizzato per la ricerca tassonomica del gruppo ha riguardato lo studio macromorfologico dei caratteri qualitativo - quantitativi.

Le condizioni essenziali per il buon esito di questa ricerca sono legate essenzialmente all'integrità degli exsiccata, allo stato di conservazione, alla rappresentatività dei campioni, che, per quanto possibile, dovrebbe riuscire a comprendere l'intero campo di variabilità dei caratteri osservabili all'interno delle popolazioni naturali.

In totale sono stati analizzati 43 caratteri (24 quantitativi, 19 qualitativi) riguardanti sia organi vegetativi (Fig. x - foglie) sia riproduttivi (Fig. x - calici). I dati quantitativi sono stati ordinati in classi di frequenza, ottenute dalle distanze di unità di deviazione standard dal valore medio; i dati qualitativi sono stati convertiti in classi numeriche.

L'elaborazione statistica della matrice dei 43 descrittori ha prodotto un dendrogramma, che nella sua topologia non rispecchia l'attuale sistema di classificazione, basato esclusivamente sui caratteri morfologici.

Come già dimostrato da studi tassonomici analoghi (Barbo, 1997), le indagini sulle variazioni morfologiche ed ecologiche hanno messo in evidenza che i limiti tra i *taxa* svaniscono quando si considerano le entità in tutto il loro campo di variabilità. Difatti, alcuni caratteri discriminanti divengono inconsistenti dal confronto con le forme non considerate tipiche e soltanto per alcuni di essi è possibile evidenziare delle differenziazioni fitogeografiche (Cagiotti *et al.*, 1990).

## Indagine molecolare

L'indagine molecolare ha interessato lo studio del genoma dei campioni d'erbario ed in particolare delle sequenze nucleotidiche degli spaziatori interni trascritti (ITS) del DNA nucleare ribosomale (rDNA).

Il principale vantaggio che deriva dall'utilizzo dei dati molecolari è rappresentato dalla molteplicità delle informazioni che si possono indagare, mentre i caratteri morfologici rappresentano soltanto una minima parte di tutte le informazioni contenute nel genoma di un organismo.

Nella presente ricerca sono state analizzate le regioni ITS di 6 sottospecie di *Anthyllis vulneraria* provenienti da 22 località dell'Appennino centrale, per un totale di circa 80 campioni collezionati a partire dagli anni '70 fino ai tempi più recenti. Al set di partenza sono state aggiunte le sequenze ITS di altre 40 accessioni, già oggetto di analisi di una precedente ricerca (Nanni *et al.*, 2004), che comprendono: 13 specie del genere *Anthyllis*, 13 sottospecie di *A. montana*, 14 sottospecie di *A. vulneraria*; infine, sono state comparate anche le sequenze di 6 sottospecie di origine baltica.

Il DNA genomico è stato isolato dalle foglie dei campioni di erbario: si tratta di un'indagine non distruttiva in quanto sono sufficienti 5 g di materiale secco (l'equivalente di una foglia di 1cm<sup>2</sup> di superficie) per estrarre una quantità di genoma sufficiente alle successive indagini.

La doppia elica di DNA di ogni regione dell'ITS è stata amplificata mediante la tecnica della PCR (polymerase chain reaction), successivamente è stata purificata e sequenziata (Fig. x- bande dna).

L'analisi filogenetica è stata realizzata secondo il metodo della distanza Neighbour-joining.

Il cladogramma prodotto dall'analisi molecolare (Fig. x- cladog) mostra che il genere *Anthyllis* risulta essere suddiviso in due sottogruppi: l'*Anthyllis vulneraria* subsp. e le specie perenni-allogame. Tutte le entità intraspecifiche di *Anthyllis vulneraria* sono raggruppate insieme e si separano dalle altre specie del genere ad un nodo ben supportato.

A livello intraspecifico, l'analisi molecolare non denota alcuna corrispondenza con l'attuale sistema di classificazione, basato esclusivamente sui caratteri morfologici, non evidenziando formazione di altre categorie tassonomiche differenti da quelle morfologiche già note.

In conclusione, la ricostruzione filogenetica basata sugli ITS suggerisce la presenza di una sola specie estremamente variabile e polimorfa in totale contrasto con la classificazione morfologica, che distingue oltre 30 *taxa* intraspecifici.

## Conclusioni

I risultati delle differenti metodologie affrontate (indagine ecologica, morfologica e molecolare) convergono verso l'ipotesi dell'affermazione di un'unica specie molto variabile e dell'assenza dei numerosi gruppi intraspecifici che la costituiscono.

Dal punto di vista ecologico, alcune sottospecie evidenziano preferenze legate soprattutto alla natura del substrato, alla fascia altitudinale e al tipo di habitat.

L'indagine morfologica ha, invece, messo in evidenza il limitato potere discriminante di alcuni caratteri finora utilizzati per la suddivisione a livello intraspecifico. La presenza di ampi intervalli di variazione risulta essere poco utile ad apprezzare la distinzione in gruppi intraspecifici.

Dalla ricostruzione filogenetica, basata sugli ITS, si evince una chiara discordanza con l'attuale sistema di classificazione, facendo protendere verso l'ipotesi di un'unica specie estremamente variabile, senza la suddivisione interna in ranghi sottospecifici.

Con i risultati ottenuti si spera di aver apportato un contributo all'individuazione in campo dei principali gruppi e al riconoscimento delle forme intermedie.

I dati acquisiti rappresentano un valido punto di partenza per lo sviluppo di ulteriori ricerche. In questo senso, la costituzione di una rete d'erbari condivisa può aumentare notevolmente la possibilità di allargare ed approfondire le linee di studio affrontate, favorendo lo scambio e la diffusione di informazioni e *exsiccata*, permettendo anche di allargare le indagini ad un contesto territoriale più esteso e ad un maggior numero di *taxa*.

## Bibliografia

- Allan G.J. and Porter J.M., 2000 - Tribal delimitation and phylogenetic relationships of *Loteae* and *Coronilleae* (*Faboideae: Fabaceae*) with special reference to *Lotus*: Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* (Am. J. Bot.) Vol. 87:1871-1881.
- Amadori M. e Gigli M.P., 1986 - Contributo alla cartografia del genere *Quercus* L. nel Lazio: censimento degli *exsiccata* di erbario. Studi sul territorio. *Ann. Bot.* Vol. XLIV, Suppl. 4: 97-112. Roma.
- Barbo M., 1997 – Aspetti biosistemati del gruppo di *Centaurea jacea* (*Asteraceae*) nell'Italia nordorientale. Tesi di dottorato. Firenze.
- Bertolani Marchetti D., 1993 – Ricerche di erbario e documentazione di biotopi caratteristici. *Webbia* 48: 183-189.
- Brown W.M., 1983 - Evolution of animal mitochondrial DNA.
- Cagiotti M. R., Pocceschi N., Ranfa A., Romano B., Fornaciari M., Miniati E., 1990 - Indagine morfologica e fitochimica sul genere *Anthyllis* L. in Italia. Estratto da: *Annali Facoltà di Agraria*, Vol. XLIV. Università degli studi di Perugia.
- Colasante M., 1983 – Genus *Iris*: reconstructed specimen lists from some Italian Herbaria. *Ann. Bot.* 41: 37-65
- Cucuini P. e Pieroni F., 1998 – Primi risultati di indagini tassonomiche, fitogeografiche e sulla storia delle collezioni ricavabili dalla catalogazione informatizzata dell'Herbarium Centrale Italicum. In Atti “Erbari ed informatizzazione”. *Informatore Botanico Italiano*, 30 (1-3) 100-102.
- Dal Vescovo G., Forneris G., Pistarino A., 1987/88 – Loci classici e tipi nelle opere e negli erbari di Allioni e di Balbis. *Allionia* 28: 5-20.
- Delisle F., Lavoie C., Jean M. e Lachance D., 2003 - Reconstructing the spread of invasive plants: taking into account biases associated with herbarium specimens. *Journal of Biogeography*, 30: 1033–1042.
- Fici S., Lo Presti R. M., 2003 - Variation in the *Senecio aethnensis* group (*Asteraceae*) along an altitudinal gradient. *Plant Biosystems*, 137 (3): 305-312.
- Gellini R., Paoletti E., 1993 – Herbarium specimens shed light on climatic and environmental changes. *Webbia* 48: 191-196.
- Gonzale Bueno A., 1993 – The herbaria as a tool for History of Science: some examples. *Webbia* 48: 219-225.
- Guo Y.-P., Vogl C., Van Loo M., Ehrendorfer F., 2006 - Hybrid origin and differentiation of two tetraploid *Achillea* species in East Asia: molecular, morphological and ecogeographical evidence. *Molecular Ecology* 15: 133-144.
- Hillis D.M., 1987 - Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 23-42.
- Li-Bing Z. e Joachim Z.W., 2004 - Classification of *Primula* sect. *Auricula* (*Primulaceae*) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146 (1): 1-26.
- Lorenzoni G.G. e Ziliotto U., 1967 – Il genere *Amarantus* dell'Erbario Veneto dell'Istituto Botanico dell'Università di Padova. *Giornale Botanico Italiano*, Vol. 72: 605-313. Firenze
- Lorenzoni G.G., 1967 – Esame sistematico dei generi *Puccinellia* e *Glyceria* dell'Erbario Veneto dell'Istituto Botanico di Padova con l'ausilio delle sezioni fogliari. *Giornale Botanico Italiano*, Vol. 72: 643-648. Firenze
- Marcussen T., Borgen L., Nordal I., 2005 - New distributional and molecular information call into question the systematic position of the West Asian *Viola sintenisii* (*Violaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 91–98.

- Marhold K., Lihová J., Perný M., Grupe R. E Neuffer B., 2002 - Natural hybridization in *Cardamine* (*Brassicaceae*) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 275–294.
- Nanni L., Ferradini N., Taffetani F., Papa R., 2004 - Molecular phylogeny of *Anthyllis* subsp. *Plant Biology* 6: 454-464.
- Pace N. R., Olsen G. J. and C. R. Woese, 1986 - Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45: 325-326.
- Pern M., Tribsch A., Stuessy T.F., Marhold K., 2005 - Allopolyploid origin of *Cardamine silana* (*Brassicaceae*) from Calabria (southern Italy): karyological, morphological and molecular evidence. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 101–116.
- Pignatti S., 1982 – *Flora d'Italia*, 2: 750-755. Edagricole. Bologna
- Shipunov A.B., Fay M.F. E Chase M.W., 2005 - Evolution of *Dactylorhiza baltica* (*Orchidaceae*) in European Russia: evidence from molecular markers and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 257–274.
- Stadler J., Mungai G. e Brandl R., 1998 - Weed invasion in East Africa: insights from herbarium records. *Afr. J. Ecol.* Volume 36: 15–22.
- Stappen J.V., Lopez S.G., Davila P., Volckaert G., 2002 - Molecular evidence for the hybrid origin of a new endemic species of *Stylosanthes* Sw. (*Fabaceae*) from the Mexican Yucatán Peninsula. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140, 1–13.
- Valedés B., 1993 – The role of herbaria in scientific research. *Webbia* 48: 163-171.
- Wissemann V. e Ritz C.M., 2005 - The genus *Rosa* (*Rosoideae*, *Rosaceae*) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and atpB-rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147, 275–290.
- Yuan Y.M. e Küpfer P., 1995 - Molecular phylogenetics of the subtribe *Gentianinae* (*Gentianaceae*) inferred from the sequences of internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 196: 207-226.