

Indagini comparative dei flavonoidi in *Viola* L. sect. *Melanium* Ging. (Violaceae) dell'Appennino centro-meridionale e della Sicilia (Italia)

G. Demaria, C. Ricceri

Riassunto - Lo studio prende in esame le specie di *Viola* L. sect. *Melanium* Ging. conosciute per l'Appennino centro-meridionale e la Sicilia al fine di accertare se alle differenze morfologiche di tali specie trovassero riscontro i dati delle indagini chemio-biologiche intraprese attraverso l'analisi dei flavonoidi. Su tale base l'indagine ha evidenziato che le specie indagate possono essere riunite in tre gruppi differenziati da alcuni flavonoidi caratterizzanti.

Parole chiave: Appennino centro-meridionale e Sicilia, flavonoidi, (Italia), Violaceae, *Viola* sect. *Melanium*

Ricevuto il 26.09.2020

Accettato il 24.11.2020

Pubblicato online il 16.12.2020

Introduzione

Nell'ambito di un programma di indagini sistematiche e chemio-bio-sistematiche sul genere *Viola* L. sect. *Melanium* Ging., già iniziato con lo studio di Moraldo et al. (2011) su *Viola calcarata* L. ssp. *cavillieri* (Becker) Merx. & Lippert e *Viola ferrarini* Moraldo et Ricceri (specie nuova per l'Appennino settentrionale), abbiamo ritenuto opportuno estendere una valutazione integrativa all'indagine tassonomica di Ricceri et al. (2018) sulle specie del genere *Viola* L. sect. *Melanium* Ging. individuate lungo l'arco appenninico che dalla Toscana si spinge alla Calabria ed alla Sicilia, mediante l'impiego dei flavonoidi come caratteri differenziali tra le varie entità.

Una vasta letteratura in proposito (Harborne 1980, 1993, Harborne, Turner 1984, Goodwin 1988, Bruce, Bohm 1998) concorda nell'attribuire a tali metaboliti secondari, e quindi alla biosintesi flavonica, una valenza correlativa a tutti i livelli sistematici tradizionali (famiglie, generi, specie), alla luce soprattutto delle funzioni che questi esplicano sulla biologia vegetale (azione protettiva dai raggi UV-B, azione contro lo stress ossidativo e calorico, azione antipatogena e antifungina, azione attrattiva verso gli insetti), rispetto ai fattori abiotici che condizionano le varie specie nell'ambiente di crescita.

Quindi, poiché i flavonoidi manifestano una notevole "costanza biosintetica" ed una ampia gamma strutturale, questi metaboliti consentono di essere assunti come validi "marcatori differenziali" entro entità diverse di un determinato gruppo a vari livelli sistematici.

Materiali e metodi

Il materiale per questa indagine è stato fornito dall'Erbario Centrale Italicum (H.C.I.) del Museo di Storia Naturale dell'Università degli Studi di Firenze, attraverso la donazione di frammenti vegetativi di *Viola* reperiti fra gli "exsiccata" ivi depositati. Frammenti già conservati in busta allegata al campione a causa di pregresse lacerazioni. In merito viene precisato che alcuni di questi sono stati prelevati da exsiccata di *Viola* donati da Moraldo B. e Pisani G. all'Erbario medesimo, exsiccata facenti parte del contingente di specie precedentemente studiate da Ricceri et al. (2018).

Per i riferimenti stazionali di ogni singolo exsiccatum, anziché riportare la trascrizione integrale dell'etichetta abbiamo ritenuto opportuno citare il numero d'inventario (es. FI-000) dato al medesimo.

La nomenclatura usata nella citazione delle specie fa riferimento al recente lavoro di Valentine et al. (1968), Pignatti (1982, 2019), Ricceri et al. (2018), Conti et al. (2005, 2006).

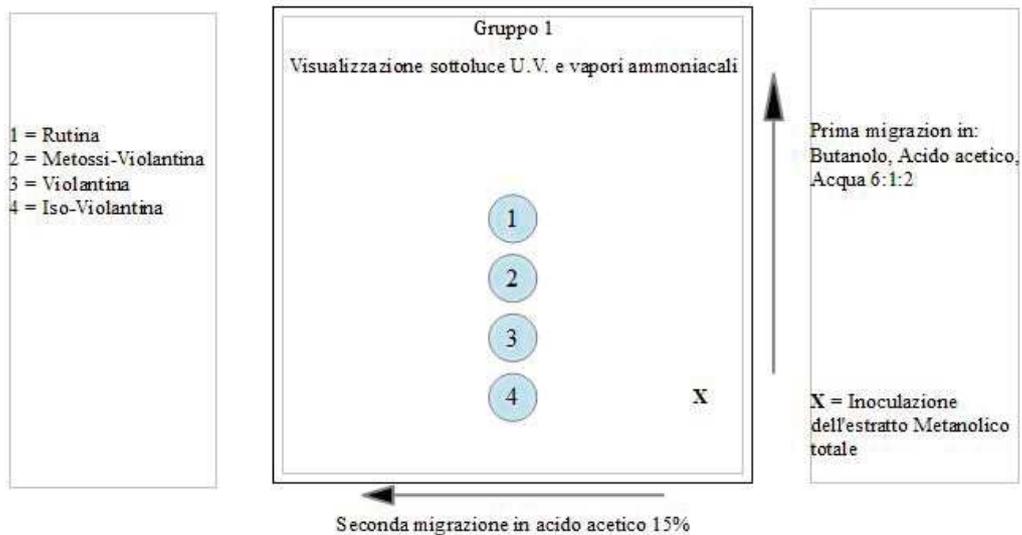
Lo studio dei flavonoidi è stato effettuato con le usuali tecniche identificative riportate in Markam (1982) e Harborne (1984).

I profili distributivi dei flavonoidi di ogni campionatura sono stati comparati tra loro evidenziando i principali flavonoidi (a maggior concentrazione) con valenza discriminante, sui quali si sono orientate le tecniche identificative più specifiche (attraverso l'impiego comparativo di "standards") comunemente riportate in letteratura, quali: la cromatografia su carta e su strato sottile (PC e TLC), l'uso di NA-reagent, l'idrolisi acida (HCl e 2N) e la spettrofotometria UV-VIS.

Risultati

Dalla comparazione di tutte le campionature esaminate è stato possibile individuare tre gruppi di taxa in base alla presenza di alcuni flavonoidi aventi caratteristiche discriminanti.

Un primo gruppo (Tav. 1) formato da: *Viola cervatiana* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1018507 paratypus), *V. splendida* W. Becker (FI-H.C.I. n. 1058550), *V. cilentana* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n.1018522), *V. subasica* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1058549), *V. pseudogracilis* Strobl (FI-H.C.I. n. 1058551), *V. calabra* (N. Terracc.)



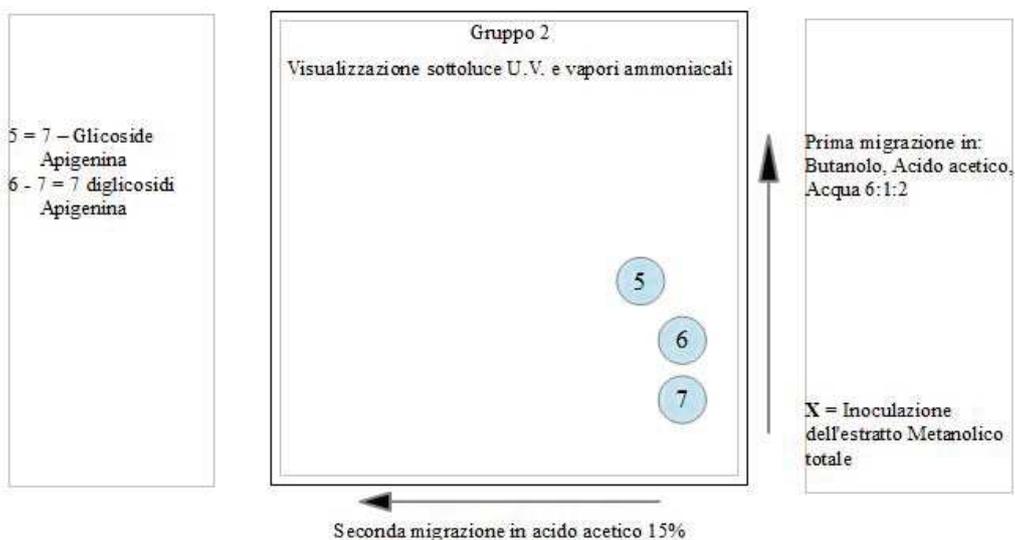
Tav. 1
Rappresentazione grafica dei patterns differenziali dei flavonoidi caratterizzanti il Gruppo 1.

Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 10585619), *V. ferdinandea* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1018536 paratypus), *V. cassinensis* Strobl (FI-H.C.I. n. 1058560), *V. sirinica* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1018579 paratypus), evidenzia la presenza, a vari livelli di concentrazione, di Rutina e di tre C-glicosil-flavoni della Apigenina Violantina, iso-Violantina e metossi-Violantina. La tendenza all'accumulo di questi flavonoidi dimostrerebbe che questo gruppo di *Viola* sia derivato da un ceppo originario "ancestrale" e che nel tempo si siano differenziate altre entità tanto da un punto di vista morfologico quanto ecologico.

A conferma di tale ipotesi, le specie di questo gruppo evidenziano la presenza/assenza di flavonoidi minori (a bassa concentrazione), specifici per ogni entità, caratterizzanti una o più specie.

Nello specifico viene evidenziato la presenza di: Rutina in *V. cervatiana*, Quercitrina in *V. pseudogracilis*, iso-Ramnetina in *V. splendida*, Quercitrina e Canferolo-glicosidi in *V. cilentana*; assenza di: Rutina e iso-Violantina in *V. calabra*, iso-Violantina in *V. ferdinandea*; presenza di Robinina in *V. sirinica*. Geograficamente questo gruppo di specie si estende dal Lazio alla Calabria con una maggiore diffusione nella Campania; il che dimostrerebbe una elevata "plasticità ecologica", nell'insediarsi in ambienti diversificati per fattori ecologici, natura del substrato e livelli altitudinali.

Un secondo gruppo di specie (Tav. 2) manifesta una tendenza all'accumulo di tre O-glicosidi della Apigenina (due 7-diglicosidi-Apigenina e uno 7-monoglicoside-Apigenina) individuabili, ora per la loro intensa fluorescenza



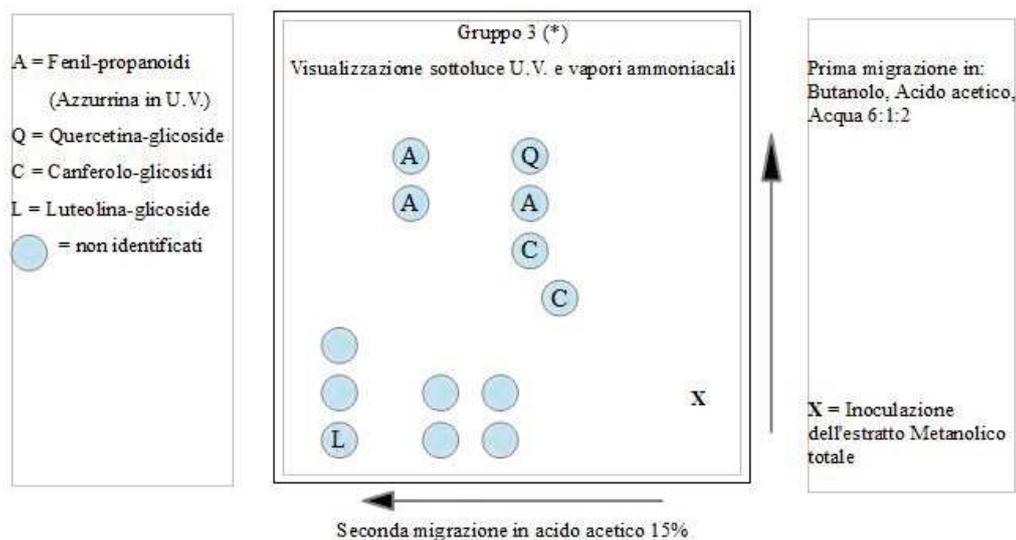
Tav. 2
Rappresentazione grafica dei patterns differenziali dei flavonoidi caratterizzanti il Gruppo 2.

verde sotto la luce UV e per vapori ammoniacali sul cromatogramma relativo, ora per l'assenza (o presenza sporadica) dei flavonoidi del primo gruppo.

Le specie afferenti a questo gruppo sono: *Viola levieri* Parlatore ex Caruel (FI-H.C.I. n. 1058557), *V. aethnensis* (Ging.) Strobl (FI-H.C.I. n. 1058562), *V. tineorum* Erben et Raimondo (FI-H.C.I. n. 1058548), *V. merxmulleri* Erben (FI-H.C.I. n. 105855) e *V. murrenensis* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1058552).

Merita ricordare che ciascuno di questi taxa evidenzia ulteriori flavonoidi minori come segue: *V. tineorum* presenta 3 flavonoidi Canferolo-glicosidi, Scopoletina (Cumarina) e Fenil-propanoidi (precursori della sintesi dei flavonoidi), la cui funzione ecologica primaria è relazionabile ad una azione schermante dei raggi UVB nocivi e Acido ferulico. In *V. aethnensis* compaiono in tracce i 3 C-glicosil-flavoni della Apigenina (Violantina, iso-Violantina e metossi-Violantina) specifici del primo gruppo, per i quali è ipotizzabile una possibile introgressione pregressa, ed inoltre la presenza di iso-Ramnetina-glicoside. In *V. levieri* si evidenziano Rutina, metossi-Violantina, ed ulteriori due Canferolo-glicosidi. In *V. merxmulleri* compaiono due flavonoidi del tipo Quercetina e Canferolo-3bioside-7glicoside, ed ulteriori tre flavonoidi minori mono-glicosidi della Quercetina, del Canferolo e Acido ferulico. Infine in *V. murrenensis* sono presenti flavonoidi a bassa concentrazione di Rutina, Violantina e iso-Violantina, elementi che fanno ipotizzare una influenza introgressiva pregressa di flavonoidi "tipici" del gruppo 1.

Un terzo gruppo è stato individuato per la estrema eterogeneità dei "patterns cromatografici" (Tav. 3), ove non erano presenti i flavonoidi distintivi del gruppo 1 e 2 e per un'ampia gamma di flavonoidi "specie-specifici", per i quali, per scarsità di materiale utilizzabile, non è stato possibile approfondire una maggiore struttura specifica. Le specie attribuibili a questo gruppo sono: *Viola alburnica* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1018393), *V. longipetiolata* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1058556), *V. vectoris* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1058536), *V. eugeniae* Parlatore (FI-H.C.I. n. 1058558), *V. magellensis* Porta et Rigo ex Strobl (FI-H.C.I. n. 1058555), *V. messanensis* (W. Becker) Brullo (FI-H.C.I. n. 1058553), *V. uciana* Erben et Raimondo (FI-H.C.I. n. 1058547), *V.*



(*) Autonomia biosintetica rispetto ai Gruppi 1 e 2 con una più ampia gamma strutturale dei flavonoidi.

Tav. 3

Pattern cromatografico di *Viola magellensis* Porta et Rigo ex Strobl.

etrusca Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1058559) e *V. amiatina* Ricceri et Moraldo (FI-H.C.I. n. 1018478).

A questo gruppo eterogeneo di *Viola* (sul quale sono in corso ulteriori indagini) si può attribuire una generale "autonomia biosintetica" dei flavonoidi derivante da una filogenesi diversificata per le varie entità, con l'eccezione della coppia *V. etrusca* - *V. amiatina* nella quale i relativi profili cromatografici coincidono per struttura e numero di flavonoidi, eccezione dovuta probabilmente per essere due schizospecie differenziate morfologicamente in ambienti e suoli diversi ma in località geograficamente molto vicine fra loro. In merito, lo studio di Clauser et al. (1992) ampliava l'areale di *V. etrusca* alle zone interne della Toscana centro-meridionale (Poggio Ritrovoli, Monte Amiata, Vivo d'Orcia e Monte Labro) pur rilevando una certa variabilità ecologica con i taxa delle Cornate di Gerfalco; successivamente, la memoria di Foggi et al. (1993), a fronte di una diversa corologia della specie, non evidenziava differenze carologiche fra le popolazioni delle Colline Metallifere ($2n=40$) e quelle di Gerfalco (Erben 1986, $2n=40$).

Nota esplicativa delle Tavole. I grafici riportati nelle Tavole sintetizzano i procedimenti analitici attuati per l'estrazione, separazione ed isolamento dei singoli flavonoidi presenti nelle diverse campionature di *Viola L.*; tecnica che riportiamo brevemente di seguito:

- 1 - Estrazione dei flavonoidi dal materiale vegetale con Metanolo (o Etanolo) al 70% con acqua.
- 2 - Purificazione dell'estratto da sostanze interferenti le successive fasi analitiche.
- 3 - Semina dell'estratto concentrato (4-5 gocce) su un foglio di carta di pura cellulosa (Watman 3MM) 30x30 cm nella posizione "X" (angolo in basso a destra).
- 4 - La prima operazione consiste nell'immersione del foglio in apposita vasca di vetro (a chiusura stagna) contenente uno strato alto circa 1 cm di una miscela di Butanolo-Acido acetico-Acqua in rapporto di 6:1:2, sospeso in maniera che il bordo inferiore "peschi" per circa ½ centimetro nella miscela. L'operazione si conclude quando la miscela di solventi raggiunge, per capillarità, il bordo superiore del foglio (prima migrazione).
- 5 - La seconda operazione si attua nelle stesse condizioni della prima (con il foglio opportunamente asciugato) ma ruotato di 90° (rotazione del foglio da sinistra a destra) e "pescaggio" per ½ cm in solvente di Acido acetico 15% (seconda migrazione).
- 6 - A foglio asciutto lo si osserva alla luce UV, convogliando vapori ammoniacali, evidenziando (cerchiando a matita) il posizionamento, le colorazioni e le dimensioni (concentrazione relativa) dei singoli flavonoidi separati fra loro dal "trascinamento" verso l'alto della miscela dei solventi, secondo un gradiente di mobilità relativa alla struttura molecolare. In tal senso si può attuare un primo "screening" comparativo tra i vari "patterns" di ogni campionatura.
- 7 - Le successive indagini prevedono operazioni analitiche più specifiche (idrolisi acida HCl 2N) di ogni singolo flavonoide, comparazione con standards scientificamente diffusi e indagini spettrofotometriche in UV-VIS.

Considerazioni conclusive

Lo studio sulla distribuzione dei flavonoidi in *Viola L. sect. Melanium* Ging. dell'Appennino centro-meridionale e della Sicilia ha consentito di confermare in linea di massima la frammentazione sistematica proposta da Ricceri et al. (2018) con alcune osservazioni contestuali.

La elevata eterogeneità dei profili distributivi dei flavonoidi testimonia senza dubbio una attività biosintetica "differenziata nelle varie entità", purtuttavia questi parametri fitochimici non sono da porsi in relazione diretta con la diagnostica morfologica tradizionale, alla luce del fatto che i flavonoidi, come altri metaboliti secondari, costituiscono un "prerequisito" filogenetico antecedente e necessario alla successiva evoluzione morfologica ed alla conseguente differenziazione sistematica nelle varie entità di determinati gruppi. Pertanto la distinzione in tre gruppi delle campionature esaminate appare giustificata dalle sopracitate motivazioni. Ciò confermerebbe quanto espresso da Küpfer (1971) in merito al gruppo "*Viola grex calcarata*" da noi indagato, secondo il quale deriverebbe "da un gruppo ancestrale" databile "nel Terziario"; gruppo di taxa arcto-alpini diffusosi dalla Penisola Iberica, sia verso l'Italia lungo le Alpi e l'arco appenninico sia verso i Balcani, ora a seguito delle glaciazioni, ora in relazione ai diversi substrati geologici.

In merito, Ricceri et al. (2018) evidenziano che i taxa esaminati popolano aree sia geograficamente disgiunte sia diverse per ecologia e natura dei substrati. L'attuale studio conferma che l'eterogeneità del corredo flavonico non dipende da questi fattori, ma bensì dalla loro filogenesi.

Ringraziamenti - Un sentito grazie al dr. Lorenzo Cecchi ed alla dr.ssa Chiara Nepi dell'Erbario Centrale Italicum di Firenze per la collaborazione fornita nel reperire ed inviare frammenti di materiale vegetativo del genere *Viola L.* essenziale per questo studio.

Letteratura citata

- Bruce A. Bohm (1998) Introduction to flavonoids. Harwood Academic Publishers.
- Clauser M, Di Fazio L, Foggi B, Selvi F (1992) Variabilità infraspécifica di *Viola etrusca* Erben (Violaceae). *Giornale Botanico Italiano* 126(2): 379.
- Conti F, Abbate G, Alessandrini A, Blasi C (Eds.) (2005) An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi Editori, Roma. 428 pp.
- Conti F, Alessandrini A, Bacchetta G, Banfi E, Barberis G, Bartolucci F, Bernardo L, Bonacquisti S, Bouvet D, Bovio M, Brusa G, Del Guacchio E, Foggi B, Frattini S, Galasso G, Gallo L, Gangale G, Gottschlich G, Grünanger P, Gubellini L, Iiriti G, Lucarini D, Marchetti D, Moraldo B, Peruzzi L, Poldini L, Prosser F, Raffaelli M, Santangelo A, Scassellati E, Scortegagna S, Selvi F, Soldano A, Tinti D, Ubaldi D, Uzunov D, Vidali M (2007) Integrazioni alla checklist della Flora Vascolare Italiana. *Natura Vicentina* 10(2006): 5-74.
- Erben M (1986) *Viola acroceraniensis* und *Viola etrusca*. Zwei neue *Viola* arten aus der section *Melanium*. *Mitteilungen Botanischen Staatssammlung München* 22: 493-506.
- Foggi B, Di Fazio L, Selvi F, Clauser M (1993) Chorological and caryological investigation on *Viola etrusca* Erben (Violaceae). *Giornale Botanico Italiano*, 127(4): 755-763.
- Goodwin T W (1988) *The Plant Pigment*. London, San Diego, Academic Press.

- Harborne J B (1980) *The flavonoids: advances in research since 1980*. Chapman and Hall, London.
- Harborne J B (1984) *Phytochemical methods*. Chapman and Hall, London.
- Harborne J B (1993) *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London.
- Harborne J B, Turner B L (1984) *Plant chemosystematic*. Academic Press, Orlando, FL 32887.
- Küpfer P (1971) Contribution à l'étude cytologique et phylogénétique de la section *Melanium* Ging. du genre *Viola* L. Note (*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris, Sér. D* – 1085. t. 272.
- Markam K R (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Moraldo B, Ricceri C, Fiorini G, Demaria G (2011) *Viola ferrarinii* Moraldo et Ricceri sp. nov. (Violaceae) from the northern Apennines (Italy). *Webbia* 66(1): 45-55.
- Pignatti S (1982) *Flora d'Italia* 2: 102-118.
- Pignatti S (2019) *Flora d'Italia* 2: 366-391; 4: 531-538.
- Ricceri C, Moraldo B, Pisani G (2018) Contributo alla conoscenza di *Viola* L. sect. *Melanium* Ging. (Violaceae) dell'Appennino Centro-meridionale e della Sicilia (Italia). *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali di Catania* 51: 181-234.
- Valentine D H, Merxmüller H, Schmidt A (1968) *Viola* L. In: Tutin T G, Heywood V H, Burges N A, Moore D M, Valentine D H, Walters S M, Webb D A *Flora Europaea* 2: 270-282. Cambridge University Press.

AUTORI

Giorgio Demaria (g.demaria40@gmail.com), Via M. Gallino 15, 16010 Savignone (Genova)

Carlo Ricceri (riccericarlo@gmail.com), Via Don Pio Vannucchi 36, 59100 Prato

Autore di riferimento: Carlo Ricceri
