

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

FACOLTÀ DI AGRARIA



Scuola di Dottorato “Ubaldo Montelatici” in Scienze e
Tecnologie Vegetali, Microbiche e Genetiche (AGR/07)

Dottorato di Ricerca in Scienze Genetiche

XXIII Ciclo

**Variabilità genetica ed analisi del flusso genico
in popolazioni di *Quercus cerris* ed *Ulmus minor***

Tutor: Prof. Alessandro Camussi

Dottorando: Dott. Bruno Bertolasi

Co-Tutor: Prof. Giorgio Binelli

Coordinatrice del corso di Dottorato: Prof.ssa Milvia Luisa Racchi

SOMMARIO

Pagina

INTRODUZIONE

1

Peculiarità genetiche ed ecologiche delle popolazioni di specie arboree forestali 1

La diversità genetica nelle popolazioni arboree forestali europee: effetto della
glaciazione e dei fenomeni di ricolonizzazione post glaciale 5

Impatto antropico sulla genetica delle popolazioni arboree forestali europee 9

La diversità genetica del cerro in relazione al contesto filogeografico delle querce
in Europa 13

Il complesso *Ulmus minor/Ulmus pumila* dopo la comparsa della grafiosi 18

MATERIALI E METODI

20

Piano di campionamento per *Quercus cerris* 20

Piano di campionamento per *Ulmus minor/Ulmus pumila* 22

Estrazione del DNA 27

Marcatori molecolari e PCR 27

Elaborazione dei dati molecolari 30

RISULTATI

33

Quercus cerris in Italia

Variabilità genetica 33

Linkage disequilibrium 47

Statistiche di Fisher 49

Isolamento da distanza	52
Struttura delle popolazioni	53
AMOVA	55
Complesso <i>Ulmus minor/Ulmus pumila</i>	
Variabilità genetica	56
Linkage disequilibrium	65
Statistiche di Fisher	67
AMOVA	70
Struttura delle popolazioni	71
DISCUSSIONE	75
<i>Quercus cerris</i> in Italia	75
Implicazioni per la conservazione	78
Complesso <i>Ulmus minor/Ulmus pumila</i>	79
Implicazioni per la conservazione	83
BIBLIOGRAFIA	85
RINGRAZIAMENTI	98

INTRODUZIONE

PECULIARITA' GENETICHE ED ECOLOGICHE DELLE POPOLAZIONI DI SPECIE ARBOREE FORESTALI

Ogni ricerca che abbia come oggetto di studio i fenomeni afferenti la genetica di popolazione di specie arboree selvatiche, i processi filogeografici, evolutivi ed adattativi di determinate specie o ecosistemi o l'elucidazione dei meccanismi che regolano la biologia riproduttiva di questi organismi deve essere guidata da alcune considerazioni preliminari e dalla comprensione di alcune specifiche peculiarità.

Le specie vegetali arboree, in termini generali, sono accomunate da una serie di tratti genetici caratteristici che le differenziano nettamente sia da organismi animali che da altre specie vegetali non arboree che possono anche far parte dello stesso ecosistema.

Benché non esista una definizione biologicamente univoca del termine "albero" la comunità scientifica è unanime nell'attribuire alle specie arboree specifiche, anche se non esclusive, caratteristiche le quali, considerate nel loro complesso, delineano quel gruppo tassonomicamente eterogeneo che definiamo "specie arboree" (Petit *et al.* 2006).

Da un punto di vista anatomico e citologico le specie arboree hanno una modalità di accrescimento flessibile, una struttura di tipo modulare, una non netta divisione della linea germinale da quella somatica, una differenziazione cellulare ampiamente reversibile ad associata ad un'elevata plasticità fenotipica.

L'habitus di crescita di tipo arboreo è una particolare strategia adattativa associata ad una dimensione superiore a quella tipica rispetto alle specie arbustive od erbacee che deve bilanciare accuratamente molti fattori in modo da conferire alle specie arboree una fitness elevata e garantirne il successo riproduttivo ed ecologico.

L'elevata statura consente l'instaurazione di un ambiente con particolari e complesse relazioni con gli altri organismi in grado di conferire notevoli vantaggi, ad esempio un incremento nel flusso genico attraverso una più ampia diffusione del polline e del seme, e la riduzione dell'influenza dei fattori biotici ed abiotici che agiscono al livello del suolo. Le notevoli dimensioni degli organismi arborei rappresentano però un notevole investimento da

un punto di vista energetico che rende possibile la presenza delle specie arboree solo in habitat in grado di garantire un livello minimo di energia, nutrienti e acqua anche nel medio e lungo periodo (Ward *et al.*, 2005) e rendono necessarie l'evoluzione di specifici tessuti con determinate caratteristiche di resistenza. I geni responsabili della crescita legnosa e delle funzioni del cambio sono comunque utilizzati da altre specie in altri processi regolativi (Groover, 2005) e questo può spiegare la facilità di evoluzione di una crescita di tipo arboreo a partire da antenati non arborei.

La produzione di semi nelle specie arboree raggiunge spesso livelli estremamente elevati se comparata a quanto avviene nelle specie erbacee ed arbustive e questo avviene al prezzo di una maggiore competizione con le risorse destinate alla crescita vegetativa che portano a tassi di crescita spesso notevolmente ridotti ed ad una ritardata maturità sessuale. La fecondità del singolo individuo però, a differenza delle specie animali, tende ad aumentare costantemente con l'età.

L'elevata longevità degli alberi rende possibile l'allocazione di risorse energetiche per futuri cicli di impollinazione e disseminazione e consente di ridurre drasticamente gli effetti demografici associati a momentanei insuccessi riproduttivi a differenza di quanto avviene normalmente nelle specie erbacee. Nelle specie arboree l'elevata longevità è quasi sempre associata ad una senescenza ritardata.

In questo quadro quindi, da un punto di vista genetico, si assiste ad un turnover generazionale piuttosto lento associato con una pressione selettiva estremamente forte nei confronti dei giovani individui. Questi fattori agiscono in intervalli di tempo molto lunghi, ed in parte antecedenti il raggiungimento della maturità sessuale, e consentono di conseguenza la sopravvivenza esclusiva di individui fortemente adattati alle condizioni ambientali locali. A differenza di altri organismi quindi la dimensione effettiva della popolazione è molto vicina alla dimensione numerica della stessa (Dodd *et al.*, 2000).

Questi organismi si possono quindi adattare ad ecologie molto differenti e talora estreme purché di tipo stabile nel lungo periodo. Attraverso l'evoluzione di particolari strutture tissutali e nella capacità di sintesi di metaboliti secondari questi organismi hanno evidenziato un successo ecologico in habitat non permissivi ad altre specie vegetali.

Le popolazioni di specie arboree esibiscono solitamente una strutturazione ridotta alla luce dei tassi elevati di flussi genici associati con l'habitus di crescita arboreo. Tuttavia la diversità genetica all'interno della singola popolazione è solitamente molto più elevata di quanto

avvenga nelle specie erbacee e le specie arboree possono manifestare adattamenti estremamente rapidi a nuove condizioni ambientali (Nybom 2004).

Queste caratteristiche sono sicuramente associate al particolare sistema riproduttivo delle specie arboree in cui l'autoimpollinazione o la riproduzione di tipo asessuato, sebbene possano essere presenti in particolari contesti ecologici in cui costituiscano un vantaggio evolutivo (ad esempio in specie pioniere in cui è preponderante la necessità di immediato successo riproduttivo od in contesti in cui la preservazione di una ridotta eterozigosità ha raggiunto un'importanza elevata), sono solitamente sostituite da svariati sistemi di impollinazione incrociata.

Molteplici fattori genetici ed ecologici concorrono a mantenere meccanismi riproduttivi di tipo allogamico. In primo luogo la presenza di una forte selezione, sia sugli individui giovani che in tutte le fasi del ciclo vitale della pianta, ha come risultato la sopravvivenza quasi esclusiva di individui risultanti da impollinazioni di tipo incrociato (Sorensen 1999, 2001). L'allogamia risulta poi favorita dalla presenza di fenomeni di depressione da inbreeding, dall'evoluzione di meccanismi di auto incompatibilità che agiscono a livello della morfologia degli organi riproduttivi e sul polline ed, in alcuni casi, dallo sviluppo di specie dioiche.

E' da considerare che la notevole lunghezza del ciclo di vita delle specie arboree, ed il conseguente inevitabile accumulo di mutazioni, può potenzialmente portare ad un tasso elevato di mutazioni recessive che potrebbero portare ad una fitness ridotta delle progenie qualora il sistema riproduttivo non fosse di tipo allogamo.

Il flusso genico intraspecifico è marcatamente elevato nelle specie ad habitus arboreo: non sono infrequenti infatti flussi di polline che raggiungono distanze di 5-10 Km (Nason *et al*, 1997) sia in specie ad impollinazione entomofila che anemofila. Una considerazione analoga può essere fatta anche per il flusso genico mediato dalla diffusione a largo raggio del seme anche se la letteratura disponibile risulta più scarsa (Clark *et al*, 1999). Si può quindi affermare che le specie arboree, a parità di sistema riproduttivo, esibiscono generalmente valori di flussi genici più elevati di quelli presenti nelle specie erbacee ed arbustive.

A livello di flusso genico interspecifico la tendenza sopra citata sembra persistere: si osserva infatti una elevata capacità delle specie arboree a formare ibridi con frequenze più elevate rispetto a quello che si osserva nelle specie erbacee. Da un punto di vista evolutivo questa peculiarità sembra spiegare l'elevato livello di diversità genetica osservato e rappresentare inoltre un mezzo per la colonizzazione di nuovi ambienti (Petit *et al*, 2004).

Un altro fattore da considerare nella promozione di una elevata diversità genetica, ottenuta tramite le ricombinazioni mitotiche, è il numero di cromosomi che è significativamente più alto nelle specie arboree rispetto a quelle erbacee.

L'elevata lunghezza del ciclo vitale inoltre promuove lo sviluppo di relazioni ecologiche molto complesse e questo fattore è in grado di contribuire al mantenimento della diversità.

Nelle nuove popolazioni inoltre un iniziale perdita di diversità genetica può essere agevolmente superata grazie alla possibilità di impollinazione da parte di popolazioni molto distanti e all'elevata età necessaria per il raggiungimento della maturità sessuale: infatti gli individui fondatori di una nuova popolazione vengono solitamente raggiunti da altri conspecifici, di differente provenienza, in tempi solitamente antecedenti il raggiungimento della piena capacità riproduttiva pertanto l'effetto del fondatore è fortemente ridotto.

A dispetto dei fattori sopra citati nelle specie arboree il mantenimento di un livello elevato di adattamento alle condizioni locali è un fattore comunemente riscontrato.

Spostando l'attenzione a livello di evoluzione molecolare è universalmente riconosciuta una tendenza delle specie arboree nell'esibire tassi di mutazione elevati associati spesso ad un elevato carico genetico (Linhart, 1999) ma questo non porta ad un accumulo più elevato di mutazioni per unità di tempo a causa di tassi metabolici più lenti e ai ridotti tassi di ricombinazione riconducibili ai lunghi tempi di generazione. Il conseguente tasso di evoluzione molecolare a livello di DNA è quindi più ridotto di quello riscontrato in specie vegetali di differente natura anche se i fenomeni sottostanti a queste osservazioni non sono completamente chiariti (Xiang *et al*, 2004).

Da un punto di vista ecologico il mantenimento di relazione con organismi di tipo mutualistico può dare conto, almeno in parte, del ridotto tasso di evoluzione molecolare.

LA DIVERSITA' GENETICA NELLE POPOLAZIONI ARBOREE FORESTALI EUROPEE: EFFETTO DELLA GLACIAZIONE E DEI FENOMENI DI RICOLONIZZAZIONE POST GLACIALE

Oltre un decennio di ricerche di stampo filogeografico su differenti specie animali e vegetali del territorio europeo, ha dimostrato che l'attuale distribuzione delle variazioni genetiche intraspecifiche nelle differenti popolazioni è il risultato di due fenomeni strettamente correlati con le intense variazioni climatiche che hanno interessato l'Europa a partire da circa 2,5 milioni di anni fa (Taberlet *et al*, 1998): la scomparsa di moltissime specie dai territori occupati dai ghiacci ed il successivo processo di colonizzazione che ha seguito la fine della glaciazione.

L'emisfero nord e quindi l'Europa ha visto il susseguirsi di oscillazioni climatiche molto marcate nel periodo Quaternario con un massimo di variazione occorso circa 700000 anni fa ed incentrato su un ciclo dominante di circa 100000 anni (Webb *et al*, 1992). L'assetto genetico delle popolazioni odierne è quindi il risultato degli eventi che hanno fatto seguito all'ultima glaciazione del tardo Pleistocene (da 130000 a 10000 anni fa) nel quale sono state riportate variazioni negative di almeno 10-14°C nella temperatura media annua in tempi di 10-20 anni e capaci di persistere per periodi di 70-5000 anni (Dansgaard *et al*, 1993).

Il territorio europeo ha attraversato un massimo glaciale (LGM) in un periodo tra 20000 e 18000 anni fa. Successivamente si è verificata una progressiva riduzione delle aree ricoperte dal ghiaccio, in relazione ad un trend di riscaldamento globale, che ha portato, circa 10000 anni fa, alla scomparsa dei ghiacci dall'Europa e, a partire da circa 8000 anni fa, ad un periodo di stabilità climatica che perdura fino ai giorni nostri.

E' quindi evidente che, in termini genetici, biologici ed evolutivi, l'intervallo di tempo in cui si sono verificati i processi di ripopolamento post glaciale è da considerarsi estremamente ridotto. Gli effetti di tali eventi sulla genetica delle popolazioni vegetali arboree europee sono quindi tangibili ed importanti.

Il territorio europeo manifesta spiccate peculiarità da un punto di vista biogeografico: la presenza del Mar Mediterraneo nella parte meridionale del continente ha reso di fatto impossibile la migrazione delle specie vegetali verso regioni situate più a sud mentre la

particolare orientazione delle Alpi e dei Pirenei ha limitato fortemente la diffusione verso nord di diverse specie nei periodi interglaciali più caldi (Taberlet *et al*, 1998).

La rapida alternanza di fasi climatiche calde e fredde nel Quaternario ha quindi provocato successive ondate di contrazione e ri-espansione degli areali naturali e le specie che occupavano queste nicchie ecologiche, da un punto di vista genetico, sono state sottoposte a fenomeni quali la perdita di biodiversità nelle popolazioni nordiche (fino ad arrivare alla totale scomparsa delle specie meno tolleranti) e successivi fenomeni di “collo di bottiglia” ed “effetto del fondatore” nei processi di ricolonizzazione a partire dalle popolazioni più meridionali.

Un'analisi comparata di differenti taxa interessati al fenomeno di ripopolamento post glaciale (Taberlet *et al*, 1998) ha rivelato una mancanza di congruenza tra i vari pattern filogeografici nei quali ogni specie sembra aver seguito un peculiare pattern di ripopolamento.

Una comparazione di differenti studi filogeografici in vari taxon ha comunque messo in luce l'esistenza di specifici territorio, definiti “aree rifugio”, nei quali le specie non tolleranti hanno mantenuto la loro presenza anche durante il LGM. Le aree rifugio sono state spesso condivise da gran parte delle specie europee specie benché non tutte abbiano occupato simultaneamente le suddette zone.

In linea generale le principali aree rifugio sono state localizzate in territori al di sotto del 46° parallelo nella Penisola Iberica, in Italia e nella Penisola Balcanica. Esistono in tal senso alcune eccezioni legate a specie con ecologie meno adattabili alle aree meridionali più calde e si ritiene che alcune zone rifugio, di estensione più limitata, possano essere dislocate in territori più settentrionali (McLachlan *et al*, 2005).

Le differenze nei profili filogeografici di ripopolamento possono essere in parte spiegate dal fatto che le prime specie o popolazioni colonizzanti una determinata area possono aver alterato le successive ondate migratorie avendo occupato la maggior parte dei territori disponibili. In secondo luogo è da rimarcare come l'accidentale estinzione di una specie in una delle zone rifugio possa spiegare, perlomeno in alcuni casi, pattern di ricolonizzazione inattesi.

E' da sottolineare come una parte della diversità genetica misurabile nelle popolazioni arboree odierne, perlomeno per alcune specie, non è attribuibile totalmente a divergenze associate con gli eventi glaciali ma è probabilmente ascrivibile anche a fattori legati all'iniziale epoca di arrivo delle differenti specie nel continente europeo come si può dedurre da analisi

di sequenze di alcuni geni in cui si evince che la divergenza è iniziata in epoche pre-pleistoceniche (Wilson *et al*, 1985).

Un certo grado di divergenza inoltre è ritenuto essere causato dall'isolamento per distanza delle zone rifugio nel LGM, in particolare tra la Penisola Iberica ed Italiana.

Un tratto comune a alcune specie che hanno occupato i territori italiani durante il LGM è la difficoltà nel ripopolare le aree più settentrionali dopo la glaciazione alla luce del fatto che alcuni genotipi sono attualmente riscontrabili solamente in Italia come è stato dimostrato per *Abies alba* (Konnert *et al*, 1995) e *Fagus sylvatica* (Demersure *et al*, 1996). La contemporanea presenza di una catena montuosa altimetricamente importante, quale quella alpina, associata alla notevole lunghezza della Penisola Italiana può dare conto di queste osservazioni.

E' stato inoltre riscontrato che in alcune zone ripopolate sono presenti genotipi provenienti da più di una zona rifugio e queste aree, benché variabili da specie a specie, sono solitamente di limitata estensione. Esse rappresentano le cosiddette "zone di sutura" (Remington, 1968) in cui si è verificata la confluenza tra i fronti migratori provenienti dai differenti rifugi glaciali. Le principali zone di sutura sono la barriera alpina e pirenaica, la zona di confine tra Francia e Germania e una ristretta area della Penisola Scandinava.

Accanto ai sopra citati effetti indotti dalla glaciazione in Europa recenti studi hanno cominciato a prendere in considerazione alcuni altri fattori che possono aver giocato un ruolo fondamentale nel modellare il quadro odierno della diversità genetica delle popolazioni arboree forestali europee. Un'analisi comparata di differenti lavori filogeografici ha portato parecchi autori a sostenere che le velocità di migrazione di differenti specie siano state probabilmente sovrastimate (Clark *et al*, 2001) a causa di particolari bias metodologici e tematici come il concentrarsi della gran parte delle ricerche su specie ad areale molto vasto.

E' stato inoltre osservato che le analisi palinologiche, sulle quali sono spesso state basate le stime della velocità di dispersione, non distinguono i pattern migratori fino al livello di specie ma tendono ad accomunare le specie dello stesso genere.

Non meno importante è il recente emergere di aree rifugio più settentrionali di quanto tradizionalmente riscontrato come dimostrato per *Picea glauca* in America settentrionale (Andreson *et al*, 2006).

Sembra quindi ragionevole supporre che realistiche stime della velocità di dispersione possano, in termini generali, essere generalmente inferiori a 100 m/anno con valori non infrequenti di soli 10 m/anno. In questa ottica appare verosimile supporre che le specie a limitato areale siano attualmente ancora circoscritte alle zone occupate nel periodo del LGM e

che per alcune altre a più ampia diffusione si debba comunque ancora raggiungere una copertura totale degli areali potenziali nonostante gli ultimi 10000 anni di relativa stabilità climatica non abbiano fatto registrare episodi di contrazione significativa delle aree ricolonizzate o arresti del processo di ricolonizzazione.

Fattori determinanti nel processo di ricolonizzazione sono quindi correlati con il numero e la collocazione geografica dei rifugi glaciali e con la permeabilità ambientale delle aree potenzialmente occupabili da un punto di vista ecologico (Svenning & Skov, 2007). E' stato anche quantificato come una semplice misura dell'accessibilità dei principali rifugi glaciali possa spiegare circa il 78% della ricchezza in termini di numero di specie e che questo termine sia il più significativo rispetto ad altri fattori bioclimatici o legati alla disponibilità di acqua dei vari ecosistemi.

IMPATTO ANTROPICO SULLA GENETICA DELLE POPOLAZIONI ARBOREE FORESTALI EUROPEE

Da un punto di vista genetico l'impatto più forte sulle popolazioni arboree selvatiche è sicuramente attribuibile all'effetto antropico che ha causato una fortissima deforestazione e conseguente riduzione demografica delle popolazioni originarie. Questo fenomeno ha interessato le specie arboree nella quasi totalità degli ecosistemi terrestri ma nel continente europeo le proporzioni che ha assunto risultano oggi drammatiche a causa di una crescita della popolazione umana molto accentuata associata ad un'agricoltura ed urbanizzazione estremamente intensive sin da epoche preistoriche.

La conseguente frammentazione delle popolazioni residuali si può suddividere, da un punto di vista ecologico e genetico, in pura perdita degli habitat, riduzione demografica dei frammenti ed incremento dell'isolamento delle varie popolazioni (Andren, 1994). Ognuno di questi fenomeni ha degli effetti genetici differenti e peculiari accanto ad alcuni tratti comuni nell'influenzare la struttura genetica delle popolazioni residuali.

Le piccole popolazioni risultano più vulnerabili all'estinzione a causa della stocasticità di mutamenti demografici ed ambientali, in relazione alla perdita di variabilità genetica (Frankham, 1996), alla perdita di alleli, all'incremento del tasso di inbreeding ed alla riduzione del numero degli eterozigoti (Young *et al*, 1996). La perdita dell'eterozigosità può portare alla fissazione di alleli deleteri nell'arco di poche generazioni mentre, nel lungo periodo, preclude la capacità di adattamento alla variazione delle condizioni ambientali nelle popolazioni che ne sono soggette.

La maggior parte degli studi genetici è stata focalizzata su specie in cui l'effetto della frammentazione e della riduzione demografica nelle popolazioni veniva ad essere monitorato su specie già fortemente minacciate o rare ma è recentemente emerso, tramite meta-analisi di molteplici ricerche incentrate su specie di più ampia diffusione e quindi ritenute inizialmente immuni dalle problematiche sovraccitate, che anche le popolazioni di specie con notevole diffusione sono geneticamente esposte agli effetti della frammentazione e della riduzione demografica in maniera analoga, se non superiore, a quanto riscontrato per le specie rare (Honnay *et al*, 2007).

Considerando poi che lo status di "specie rara" è molto spesso il risultato di una riduzione demografica, attribuibile a cause antropiche, avvenuta in tempi biologicamente rapidissimi se

equiparati ai naturali ritmi evolutivi delle specie è presumibile che, nella maggior parte dei casi, gli effetti genetici negativi precedentemente menzionati debbano ancora manifestarsi completamente.

La frammentazione delle popolazioni e la riduzione della dimensione delle stesse porta ad una significativa riduzione di parametri genetici quali il numero di alleli per locus (A) e la percentuale di loci polimorfici (P). La dimensione delle popolazioni residuali ha un effetto più ridotto sull'eterozigosità attesa (H_e) indicando che l'erosione genetica inizia dapprima su gli alleli presenti a più bassa frequenza nelle popolazioni originarie (Honnay *et al*, 2007).

In termini di eccesso di omozigoti, parametro genetico valutato tramite la statistica di Fisher F_{IS} , la riduzione numerica e la frammentazione non paiono avere effetti significativi e questo può essere spiegato con una sottostima del tasso di inbreeding in piccole popolazioni in cui l'omozigosità per alleli rari può risultare assente (ridotto F_{IS}) a differenza di quanto avviene nelle grandi popolazioni, che esibiscono solitamente una sottostrutturazione accentuata, dove l'inbreeding può essere sovrastimato (elevato F_{IS}) per effetto Wahlund (Lowe *et al*, 2004).

Il modesto effetto della frammentazione e della riduzione demografica tuttavia, benché non sia ritenuto capace di influire sulla fitness di una specie nel breve periodo, è tuttavia capace di ridurre significativamente il potenziale adattativo sia nelle specie rare che in quelle comuni, perlomeno nel lungo periodo (Ellstrand *et al*, 1993).

Il tipo di biologia riproduttiva delle specie considerate può portare ad una diversa sensibilità agli effetti negativi della frammentazione degli habitat: le specie classificabili come ad impollinazione incrociata obbligata o prevalente infatti risultano più sensibili di quelle autoimpollinanti. Le specie ad impollinazione entomofila inoltre non paiono essere immuni dalle problematiche discusse in forza della specificità delle relazioni mutualistiche che intrecciano con i pronubi in quanto quest'ultime risultano pesantemente affette dalla frammentazione e dalla riduzione delle popolazioni ospiti (Wilcock *et al*, 2002).

Alcuni autori hanno recentemente evidenziato che gli effetti della degradazione genetica possono essere sovrastimati se comparati a quelli derivanti dalla degradazione degli ecosistemi (Kramer *et al*, 2008).

Si è posto l'accento sull'esistenza di marcate differenze tra le specie arboree selvatiche di ambienti tropicali che si sono evolute in ecosistemi estremamente complessi (800-1000 specie arboree) e la cui densità può arrivare a valori particolarmente bassi (0,1-1 individui/ha), anche nel caso di popolazioni non perturbate da effetti antropici, stigmatizzando l'importanza dei fattori ecologici. Le foreste temperate d'altro canto hanno un

numero ridotto di specie (2-20 specie arboree) ma densità più elevate (anche superiori a 80 individui/ha). E' stato ipotizzato che le foreste temperate possano essere più sensibili ai rischi della frammentazione rispetto alle specie evolutesi nelle foreste tropicali in quanto l'ecologia di quest'ultime le pone parzialmente al riparo dai problemi dell'isolamento genetico e che quindi il rischio maggiore sia rappresentato dalla scomparsa o dalla alterazione degli ecosistemi.

Alcuni studi hanno dimostrato come l'efficienza riproduttiva di specie tropicali e subtropicali possa essere più elevata in popolazioni frammentate di quanto non lo sia in popolazioni all'equilibrio (Boshier *et al*, 2004). Tuttavia, benché il flusso genico osservato sia in alcuni casi più elevato nelle popolazioni isolate, la fitness della progenie appare spesso ridotta se comparata a quella di popolazioni non isolate ed in condizioni di equilibrio genetico. La misurazione della fitness della progenie è un parametro ottimale per valutare adeguatamente il peso della degradazione genetica, ad esempio per quella causata da fenomeni di depressione da inbreeding, tuttavia i dati disponibili sono attualmente ridotti e si osservano alcuni risultati discordanti.

In alcuni casi appare chiaro che, a causa dei movimenti a lungo raggio del polline e talvolta dei semi, le popolazioni frammentate non possano essere considerate totalmente in isolamento e di conseguenza le previsioni teoriche della genetica di popolazione applicabili a queste casistiche debbano essere mitigate (Kramer *et al*, 2008). A sostegno di queste osservazioni sono stati evocati esempi di curve di dispersione a spiccata leptocurticità sia per il polline (Nason *et al*, 1997) che per il seme (Clark *et al*, 1999).

Altri autori sostengono che le alterazioni genetiche, misurabili nelle popolazioni alterate dall'effetto antropico, non possono essere attribuite con certezza all'effetto della frammentazione e riduzione demografica in quanto, a causa della lunghezza del ciclo vitale delle specie arboree e del fatto che le alterazioni antropiche sono relativamente recenti, le attuali popolazioni sono equiparabili, da un punto di vista dell'assetto genetico, ad una situazione pregressa all'azione antropica (Kramer *et al*, 2008). Si ritiene pertanto che gli eventuali effetti genetici, qualora gli stessi risultassero rilevanti rispetto alle alterazioni derivanti dalla degradazione degli habitat, necessitino di orizzonti temporali molto più ampi di quelli monitorati dalla maggior parte degli studi di genetica di popolazione per giungere ad avere una certa rilevanza e che, per un ragionevole intervallo di tempo, le alterazioni genetiche stesse possano essere tamponate, entro un certo limite, da fattori di tipo ecologico (Kenta *et al*, 2004).

Chiaramente sia i fattori ecologici che genetici risultanti a seguito delle alterazioni antropiche sono rilevanti ma è opportuno evitare di trarre conclusioni troppo generali in quanto l'effetto complessivo può essere anche molto diverso a seconda delle specie e delle ecologie considerate.

LA DIVERSITA' GENETICA DEL CERRO IN RELAZIONE AL CONTESTO FILOGEOGRAFICO DELLE QUERCE IN EUROPA

Il cerro (*Quercus cerris* L.) è una specie di quercia caducifolia, ad areale principale italiano e balcanico, in grado di adattarsi facilmente ad ecologie diverse (Abbate *et al*, 2005). Nel nord Italia è sporadicamente presente in pianura dove coesiste talvolta con altre specie ma, considerando la ridottissima presenza di formazioni forestali planiziali, è probabile una presenza più significativa nel passato. In questo contesto è in grado di occupare nicchie ecologiche meno umide di quanto richiesto da specie di quercia più esigenti sotto questo profilo come la farnia (*Quercus robur* L.). Nelle zone collinari tende ad occupare invece sole le stazioni tendenzialmente meno aride essendo altrove sostituito da specie più xeriche quali la rovere e la roverella (*Quercus petraea* L. e *Quercus pubescens* L.). E' presente anche in regioni montane fino ai 1200 metri se l'esposizione è meridionale. Nel centro della Penisola Italiana tende a formare popolamenti più puri purché le condizioni igrometriche siano permissive. Questa specie non è presente in Sardegna ed in Corsica mentre nel sud Italia, ed in particolare in Sicilia, la sua diffusione è limitata a zone interne, altimetricamente più elevate e piovose.

La maggior parte degli studi di genetica di popolazione delle querce si sono concentrati su specie a diffusione più estesa, in particolare farnia e rovere, anche alla luce della peculiare importanza economica delle stesse. Non sono quindi attualmente reperibili lavori di stampo genetico o filogeografico su *Q. cerris* benché questa specie sia stata comunque tenuta in considerazione in molteplici ricerche su altre specie del genere *Quercus* come entità di paragone.

E' tuttavia indubbio come l'importante corpus costituito dai lavori di carattere ecologico, palinologico, filogeografico e genetico che è reperibile per altre specie di quercia sia di capitale importanza in un piano sperimentale volto ad indagare la specie *cerris* in primo luogo alla luce di alcuni evidenti aspetti ecologici ed evolutivi condivisi ed afferibili all'appartenenza al medesimo genere tassonomico ed in seconda battuta alla luce della considerazione che le conclusioni delle sovra citate ricerche costituiscono, di per se stesse, una base di partenza che sarebbe opportuno non ignorare. In relazione a questo ultimo aspetto si vuole sottolineare come, ad esempio, le conclusioni dei lavori di impronta palinologica, pur nella consapevolezza che tali metodologie non permettono la distinzione delle specie di quercia (Brewer *et al*, 2002), potrebbero essere estendibili anche alla specie *Q. cerris*.

Anche altri studi di impronta più ecologica (es: Grivet *et al*, 2006, Svenning *et al*, 2007), costituiscono indubbiamente un importante punto di riferimento alla luce dei tratti comuni per quanto riguarda la biologia riproduttiva, i processi di disseminazione ed i medesimi effetti attribuibili al periodo glaciale.

Alla luce di quanto detto appare quindi opportuno riportare i tratti più generali delle ricerche incentrate sul complesso delle querce bianche (*Q. robur*, *petraea*, *pubescens*, *frainetto*, *faginea*, *pyrenaica*, *canariensis* e *macranthera*) mettendo in luce, ove possibile, le eventuali discrepanze emerse nel confronto con *Q. cerris*.

Come ricordato in precedenza la presenza di un massimo glaciale (LGM) tra 15000 e 10000 anni fa ha pesantemente alterato la flora europea ed i processi di ricolonizzazione post glaciale, associati a fenomeni quali le limitazioni della dispersione dei semi dalle zone rifugio o la competizione tra differenti specie, hanno giocato un ruolo determinante nel configurare l'attuale assetto genetico delle popolazioni vegetali.

Tutto questo è assolutamente vero in generale per il genere *Quercus* nel suo complesso in quanto entità tassonomica ad ecologia prettamente mesofila e quindi anche per la specie *cerris* che ha probabilmente risentito in modo ancora più pesante dei fenomeni in questione, alla luce del fatto che il suo attuale areale è limitato a circa la metà delle aree che sarebbero potenzialmente occupabili da un punto di vista climatico (Svenning *et al*, 2007).

Per il complesso degli studi sulle querce bianche i dati palinologici indicano la presenza di due tipi di aree rifugio: nei cosiddetti rifugi primari la deposizione di polline è stata continua e non si è arresta nemmeno in occasione del LGM mentre nei rifugi secondari, situati a latitudini più settentrionali (circa 44-46°) la deposizione è avvenuta discontinuamente e si è arresta, o ridotta, durante le fasi di temporaneo raffreddamento tipiche della natura non lineare dei fenomeni climatici in senso alla glaciazione.

I rifugi primari per il genere *Quercus* sono situati all'estremo limite meridionale dell'Europa in sud Italia (Laghi di Monticchio, PZ), nella penisola balcanica (Ioannina, Grecia) e nel sud della Penisola Iberica (Padul, Spagna) (Brewer *et al*, 2002). Esistono probabili ulteriori rifugi primari in Sicilia, Sardegna, nord del Marocco e della Turchia, Crimea, e sud del Portogallo ma i dati palinologici non lo confermano appieno.

L'identificazione dei rifugi secondari è più nebulosa considerando anche il fatto che non è chiaro fino a che limite settentrionale gli stessi potessero spingersi, ad esempio durante il raffreddamento temporaneo del Dryas recente, ma è estrapolabile dalla distribuzione degli

aplotipi dedotta dagli studi genetici: Croazia, Costa Azzurra, Andalusia e centro nord del Portogallo (Petit *et al*, 2002).

Un'importante dato è relativo specificamente al cerro per il quale si è identificata un'area nel sud ovest della Turchia nella quale i pollini sono stati attribuiti con certezza a questa specie e che potrebbe costituire una zona rifugio estremamente specifica (Bottema *et al*, 1991).

In termini generali i rifugi tendono ad avere una latitudine superiore mano a mano che ci si distanzia dalla costa atlantica a causa di un'alterazione delle correnti oceaniche presente durante i periodi glaciali in grado di raffreddare maggiormente le regioni costiere. Da un punto di vista altimetrico la locazione in zone generalmente montagnose è spiegabile con una piovosità superiore rispetto a regioni pianiziali durante l'arido periodo glaciale.

Nel caso delle querce la ricolonizzazione post glaciale appare essersi verificata in due ondate successive: dopo un'iniziale espansione a partire dall'ultimo periodo interglaciale (13000-11000 anni fa) si osserva un temporaneo arresto in occasione del raffreddamento del Dryas recente (circa 11000-10000 anni fa) con una successiva ed ininterrotta ripresa.

In Italia la ricolonizzazione dai rifugi meridionali ha proceduto lungo la catena appenninica in modo rapido (è stata avanzata anche l'ipotesi della presenza di un rifugio, non ancora identificato, nel centro della penisola) (Brewer *et al*, 2002) raggiungendo le Alpi alla fine dell'ultimo interglaciale. Da qui, anche a partire dai rifugi secondari, l'espansione è successivamente proseguita verso nord, est ed ovest con un pesante effetto frenante imputabile alla presenza della catena alpina.

Nella prima ondata di espansione è evidente come i fattori climatici hanno avuto un ruolo fondamentale mentre successivamente altri aspetti quali la competizione tra le differenti specie nell'occupare i territori favorevoli, la morfologia del territorio ed i fattori edafici (Brewer *et al*, 2002) sono risultati sempre più importanti accanto ai problemi connessi con le limitazioni nella dispersione dovuti alla limitata accessibilità dei rifugi glaciali (Svenning *et al*, 2007).

Gli studi filogenetici sulle querce in Europa sono stati in gran parte basati su analisi del genoma plastidiale del cloroplasto: considerando il fatto che, in questo genere tassonomico, la trasmissione dei genomi organellari avviene per linea materna (Dumolin-Lapègue *et al*, 1995) il cpDNA è apparso il candidato ideale per gli studi filogeografici in quanto idoneo a caratterizzare le singole popolazioni e a chiarirne i meccanismi evolutivi.

Il tratto caratteristico che accomuna molti degli studi di questo tipo è l'emergere di una notevole condivisione delle varianti del cpDNA tra specie di quercia differenti ma, allo stesso

tempo, appare evidente come le differenti specie partizionino la diversità genetica con differenti profili (Dumolin-Lapègue et al, 1999a). Solamente gli aplotipi più rari sono appannaggio esclusivo di una sola specie inoltre un confronto tra il complesso delle querce bianche e altre specie del genere *Quercus* ha evidenziato come le specie *cerris*, *ilex* e *suber* non condividano nessun aplotipo costituendo quindi delle linee nettamente distinte come è deducibile dall'analisi degli alberi filogenetici (Petit et al, 2002a).

Un'analisi della ricchezza allelica e dei parametri di diversità genetica, basati sul calcolo delle frequenze alleliche dei differenti aplotipi, con o senza una misura della distanza genetica tra gli stessi, ha permesso l'elaborazione di coefficienti di differenziazione genetica (N_{ST} e G_{ST}) per le differenti specie di quercia e per le differenti regioni europee dal cui confronto è stato possibile ricavare alcune considerazioni generali.

In termini generali la gran parte degli aplotipi meridionali sono presenti in regioni al di sopra del 45° parallelo mentre il contrario è verificato solo in un numero di casi molto ridotto: si tratta di una fortissima evidenza genetica a sostegno della localizzazione meridionale delle zone rifugio per tutte le specie di quercia.

La divergenza notevole tra alcuni aplotipi, nonostante l'estesa condivisione degli stessi tra specie ad ecologie anche piuttosto differenti, è paragonabile con la divergenza che si osserva con gli aplotipi di specie esterne al gruppo delle querce bianche (*Q. cerris* e *Q. suber*) anche se questa osservazione non è estendibile ad un'altra specie tradizionalmente considerata lontana: *Q. ilex*.

In relazione ai livelli di ricchezza allelica ed ai coefficienti di diversità genetica (calcolati tenendo conto o meno della distanza genetica tra gli aplotipi) è possibile spiegare l'attuale assetto genetico in relazione agli eventi post glaciali.

Regioni quali la Penisola Iberica e la Penisola Balcanica esibiscono livelli di ricchezza allelica molto alti ma associati ad una variabilità imputabile essenzialmente a quella presente all'interno di un ridotto numero di genealogie: questa situazione è indicativa di siti che hanno costituito un rifugio glaciale. Quando la ricchezza allelica si mantiene invece elevata ma la variabilità è in buona parte attribuibile alle differenze esistenti tra le diverse genealogie si è invece in presenza di una mescolanza di differenti aplotipi che provengono da genealogie differenti: è il caso, ad esempio, della parte centrale dell'Europa e dell'Italia peninsulare. Anche nel caso di un livello intermedio di ricchezza allelica si osserva un'associazione sia con un tipo di variabilità attribuibile a quella presente all'interno delle differenti genealogie oppure legata alla coesistenza di differenti linee ed i due casi sono associati rispettivamente

ad una colonizzazione non bilanciata dai vari rifugi (es: la Francia in cui si ha una prevalenza degli aplotipi di origine iberica) o al caso di una colonizzazione più uniforme (es: la regione delle Alpi). Infine, nel caso di ricchezza allelica bassa e di variabilità genetica attribuibile esclusivamente alla divergenza degli aplotipi, si è in presenza di eventi di colonizzazione da un singolo rifugio come si riscontra nelle Isole Britanniche (Petit *et al*, 2002a).

IL COMPLESSO *Ulmus minor/Ulmus pumila* DOPO LA COMPARSA DELLA GRAFIOSI

L'olmo (*Ulmus minor* L.) è una specie arborea caducifoglia largamente diffusa in Europa. L'areale naturale è incentrato sulle regioni centro-meridionali del continente ma non è infrequente in stazioni più settentrionali come ad esempio le Isole Britanniche (Abbate *et al*, 2005). Si tratta di una specie di notevoli dimensioni (25-30 m) ed estremamente longeva che ha costituito, fino al periodo antecedente la comparsa della grafiosi, una specie dominante dei piani forestali europei. La sua diffusione, grazie alla grande adattabilità, alla rapida crescita ed alla disseminazione entomofila, è elevata in tutte le zone planiziali ed è stata favorita dall'uomo anche al di fuori delle popolazioni selvatiche essendo presente ai margini delle zone coltivate e nelle città. In passato è stato coltivato, oltre che per il legname e per scopo ornamentale, anche come tutore vivo in viticoltura e per la creazione delle siepi campestri. A più elevate latitudini ed altitudini questa specie è sostituita da *U. glabra* L. o da *U. laevis* L. con prevalenza di quest'ultima nelle zone umide e ripariali.

L'olmo siberiano (*Ulmus pumila* L.) è una specie originaria dell'Asia (Cina, Siberia orientale, Corea e Mongolia) tipica di ecologie relativamente aride associate ad ambienti stepposi. Questa specie è stata introdotta in Europa, con finalità ornamentali, a partire dal sedicesimo secolo ma solo nel corso del '900 (epoca approssimativa di introduzione per il Nord America) se ne segnala un uso più consistente ed una rapida naturalizzazione nelle campagne e nei contesti urbani incolti. E' attualmente considerata una specie invasiva sia in Europa che nel Nord America.

L'attuale assetto ecologico e genetico del genere *Ulmus* nel suo complesso, ed in particolar modo per la specie *minor*, è il risultato dell'effetto della recente diffusione di due patogeni fungini strettamente imparentati, *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. (precedentemente noto come *Ceratocystis ulmi*) e *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier) che ne hanno ridotto massicciamente la presenza numerica e modificato radicalmente l'ecologia nel corso del XX secolo.

Si tratta di due specie fungine di origine asiatica appartenenti al phylum Ascomycota (Brasier, 1977) in grado di causare una tracheomicosi (comunemente nota come grafiosi) in diverse specie del genere *Ulmus*. *U. minor* ne è particolarmente sensibile mentre la specie più resistente è rappresentata da *U. pumila* che, avendo un'origine asiatica ed essendosi coevoluta

con il patogeno, manifesta notevoli livelli di resistenza. Il patogeno fungino è veicolato da alcuni coleotteri parassiti degli olmi (generi *Scolytus* e *Pteleobius*): i propaguli vengono introdotti all'interno dei canali scavati dagli insetti nei fasci linfatici dove il fungo inizia a colonizzare l'intera pianta provocandone un progressivo avvizzimento e la morte. Gli esemplari adulti, specie quelli di grosso diametro, risultano più sensibili alla malattia rispetto agli esemplari più giovani che ne sono relativamente immuni, almeno fino al raggiungimento di un sufficiente diametro del tronco e delle branche principali.

In relazione a questo fattore la specie *U. minor* non si può considerare a rischio di estinzione in quanto anche gli esemplari giovani riescono spesso a riprodursi efficacemente. Tuttavia l'effetto della pandemia ha provocato una riduzione massiccia della presenza demografica dell'olmo ed una profonda alterazione dell'habitus di crescita della specie che è passata da albero di prima grandezza ad un arbusto pollonante.

L'epidemia di grafiosi si è sviluppata in due successive ondate (Santini *et al*, 2005) nel corso del XX secolo. Probabilmente a causa della movimentazione di legname infetto *Ophiostoma ulmi* è stato introdotto in Europa nei primi anni del '900 dall'Asia. La prima ondata di grafiosi ha provocato danni limitati alle popolazioni europee di olmo e successivamente si è progressivamente ridotta per il prevalere di ceppi fungini scarsamente virulenti. Una seconda ondata, a partire dai primi anni '70 del XX secolo è stata causata da una specie distinta: *Ophiostoma novo-ulmi*. Questa specie è comparsa inizialmente nell'est europeo a partire dagli anni '40 (ssp. *novo ulmi*) mentre un altro ceppo è stato introdotto dal Nord America (ssp. *americana*). In Europa le due sottospecie si sono ampiamente diffuse ed hanno provocato danni ingentissimi alle popolazioni naturali e non di *U. minor* mentre la specie aliena *U. pumila* è stata affetta in modo molto più marginale.

Recenti studi genetici su differenti popolazioni del patogeno in Italia hanno dimostrato la pressoché totale scomparsa della specie *Ophiostoma ulmi* e la presenza esclusiva della specie *Ophiostoma novo-ulmi*. Considerazioni di tipo morfologico e genetico hanno evidenziato che il patogeno ha assunto un assetto compatibile con una fase post-epidemica di equilibrio con l'ospite (Santini *et al*, 2005) anche se si può trattare di una situazione momentanea che può potenzialmente mutare in relazione, ad esempio, all'introduzione massiccia di cloni più resistenti rispetto alle specie originarie.

E' da sottolineare infatti che sono in corso molteplici programmi di miglioramento genetico basati essenzialmente sulla selezione di linee di *U. minor* resistenti e sulla produzione di ibridi artificiali con *U. pumila* per introdurre un certo grado di resistenza.

MATERIALI E METODI METODI

PIANO DI CAMPIONAMENTO PER *Quercus Cerris*

La ricerca ha interessato 23 popolazioni di cerro distribuite in tutta la Penisola Italiana all'interno dell'areale naturale della specie (Fig.1). Due popolazioni sono di provenienza siciliana mentre non sono disponibili popolazioni sarde o corse in quanto la specie non è naturalmente presente in queste zone (Abbate *et al*, 2005).

Considerando la notevole variabilità dei tratti morfologici e la presenza di differenti specie di quercia simpatriche non facilmente distinguibili (in particolar modo nel sud Italia) particolare cura è stata posta nell'attribuzione specifica delle piante campionate identificando i tratti morfologici più caratteristici (Abbate *et al*, 2005).

Da un punto di vista ecologico lo studio è stato impostato esclusivamente su popolazioni di origine naturale in cui si può ragionevolmente escludere l'impianto di provenienze non locali in precedenti interventi selvicolturali.

Le piante campionate si trovano ad almeno 100 m di distanza e per ciascun esemplare sono state raccolte 3-4 foglie giovani e non alterate da attacchi parassitari. I campioni sono stati conservati in etanolo al 95% a temperatura ambiente fino al momento dell'estrazione del DNA.



Fig. 1: Popolazioni di *Quercus cerris* oggetto di studio.

- | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| 1 Casale Monferrato (AI) | 7 Campofontana (VR) | 13 Cala Violina, Follonica (LI) | 19 Barisciano (AQ) |
| 2 Laveno, Monte Sangiano (VA) | 8 Colli Berici (VI) | 14 Manziana (ROMA) | 20 Monte Conero (AN) |
| 3 Esenta (BS) | 9 Albarè di Costermano (VR) | 15 Ficuzza (PA) | 21 Bari |
| 4 Val trompia, Lodrino (BS) | 10 Dolegna del Collio (GO) | 16 Matera | 22 Monghidoro (BO) |
| 5 Bosco della Fontana (MN) | 11 Ligonchio (RE) | 17 Sabaudia (ROMA) | 23 Vercelli |
| 6 Bedonia (PR) | 12 Bagno di Romagna (FC) | 18 Mongiana (VV) | |

PIANO DI CAMPIONAMENTO PER *Ulmus minor*/*Ulmus pumila*

Lo studio del complesso *Ulmus minor*/*Ulmus pumila* ha interessato due stazioni nel Nord Italia in cui si è riscontrata la presenza simultanea di entrambe le specie. Nei due contesti sono stati scelti gli esemplari di *U. minor* sono di origine selvatica e, nel caso di formazioni più diffuse e frammentate ad aree coltivate, di origine comunque spontanea. Anche gli esemplari della specie aliena *U. pumila* derivano da una disseminazione spontanea in quanto sono state escluse le piante impiantate a scopi ornamentali (es. viali alberati, giardini ecc..).

Durante il campionamento i differenti esemplari sono stati classificati in tre gruppi sulla base dei tratti morfologici più caratteristici quali la morfologia fogliare, il portamento e la presenza di formazioni suberose sui ramuli (Abbate *et al*, 2005): *U. minor*, *U. pumila* ed ad attribuzione incerta (putativi ibridi).

Le piante campionate si trovano ad almeno 100 m di distanza e per ciascun esemplare sono state raccolte 3-4 foglie giovani e non attaccate da parassiti. I campioni sono stati conservati in etanolo al 95% a temperatura ambiente fino al momento dell'estrazione del DNA.

Le piante campionate sono state sottoposte a georeferenziazione tramite utilizzo di GPS.

La prima popolazione è situata nel comune di Porporana (FE) sulla riva destra del Po. Si tratta di una formazione ripariale di origine selvatica, ecologicamente ascrivibile ad un bosco planiziale, con una notevole ricchezza di specie e non sottoposta ad interventi selvicolturali perlomeno in tempi recenti (Fig.2). La dimensione del bosco è di circa 550 x 150 m e l'unica specie di olmo presente è costituita da *U. minor*. Il popolamento appare in buone condizioni fitopatologiche e sono presenti anche esemplari di grosse dimensioni tuttavia una porzione marginale dello stesso presenta alcuni esemplari uccisi dalla grafiosi. Il campionamento ha interessato la totalità delle piante adulte (diametro del tronco superiore a 5 cm).

Il campionamento è stato successivamente esteso alle zone circostanti su una superficie circolare, di raggio approssimativo 5 Km, incentrata sulla formazione boschiva ripariale (Fig.3). In questa zona sono presenti simultaneamente tutte e due le specie di olmo che crescono ai margini di seminativi.

Nel corso di due successivi anni da alcune piante adulte dell'area circondariale, selezionate in base alla sicura attribuzione morfologica alla specie *U. minor* o *U. pumila*, sono stati raccolti semi da destinare alla produzione di plantule per uno studio dei flussi genici (Tab. 2).



Fig.2: Nucleo interno ripariale, Porporana (FE).



Fig.3: Porporana(FE), zona circostante.

La seconda popolazione si trova nei pressi di Muzzana del Turgnano (UD) in un'area di pianura intensamente coltivata ma nella quale sono ancora presenti piccole superfici relittuali di bosco planiziale di origine naturale. L'area presenta la commistione di entrambe le specie ed è di forma approssimativamente rettangolare con dimensione di circa 10 x 20 Km (Fig.4). Anche per questa zona, da alcune piante di ambo le specie, è stato raccolto il seme per due anni consecutivi, da impiegare in successivi test (Tab.2).

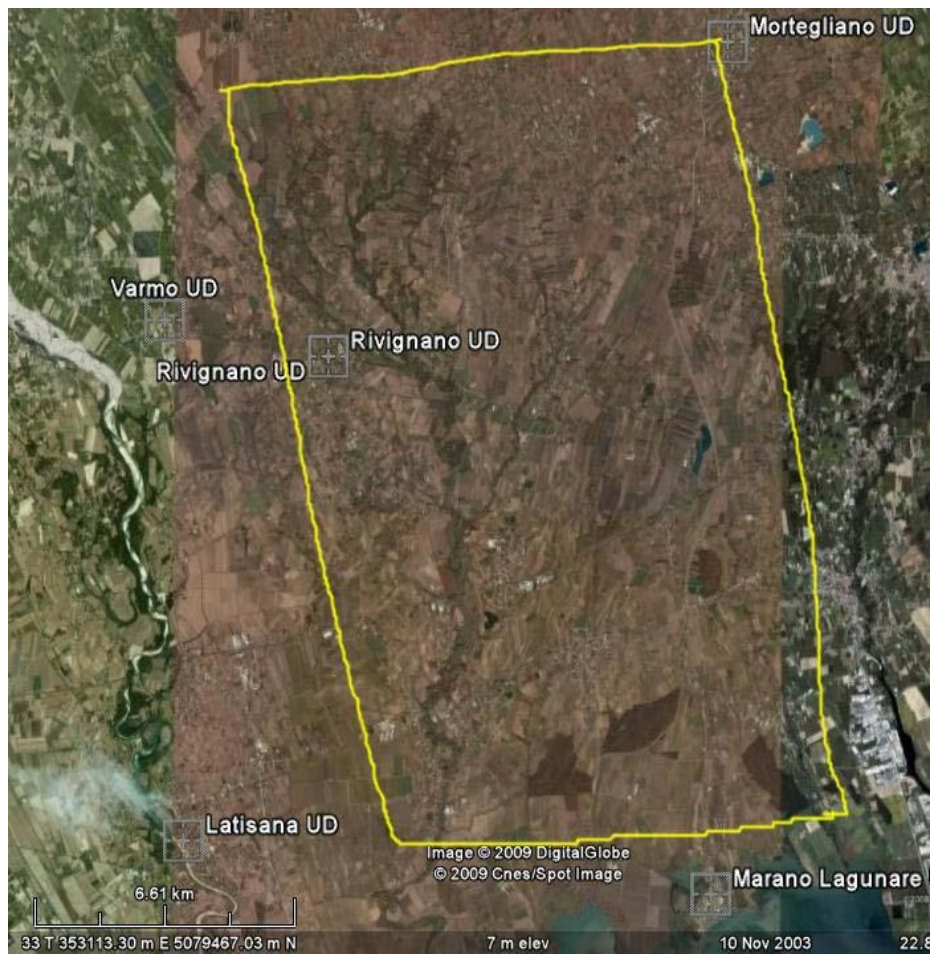


Fig.4: Muzzana del Turgnano (UD).

POPOLAZIONE	<i>U. minor</i>	<i>U. pumila</i>	Attrib. incerta	TOTALE
Porporana (nucleo centrale)	350	-	-	350
Porporana (area circostante)	58	24	7	89
Muzzana del Turgnano	59	28	4	91
TOTALE	467	52	11	530

Tab.1: campionamento esemplari adulti *U. minor/U.pumila*.

POPOLAZIONE	TOT. ADULTI	ADULTI PROGENY TEST (I ANNO)	ADULTI PROGENY TEST (II ANNO)
Porporana (nucleo centrale)	350	1	1
Porporana (area circostante)	58	23	27
Muzzana del Turgnano	59	8	8

Tab.2: raccolta seme da esemplari adulti *U. minor/U.pumila*.

ESTRAZIONE DEL DNA

I campioni fogliari sono stati conservati, a temperatura ambiente, in etanolo 95% fino al momento dell'estrazione. Prima di procedere con la stessa le foglie sono state reidratate con progressive immersioni in soluzioni di etanolo a concentrazione decrescente (70-50-30%-acqua distillata), della durata di un giorno, sempre a temperatura ambiente. Il materiale reidratato e non sottoposto ad estrazione è stato successivamente conservato a -20°C.

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da un frammento fogliare, di circa 1 cm², tramite il kit DNeasy™ Plant Mini Kit (Qiagen). La qualità e la concentrazione DNA isolato è stata verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% (10 V/cm) e confronto con uno standard di peso molecolare (GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas Life Sciences).

MARCATORI MOLECOLARI E PCR

Sia lo studio su *Q. cerris* che quello sul complesso *U. minor/U. pumila* sono stati basati sull'utilizzo di loci microsatelliti nucleari, riportati in letteratura, isolati sia dalle specie oggetto di studio che da altre tassonomicamente vicine (Tab.3-4). A seguito di prove preliminari il set di microsatelliti scelto è risultato il migliore dal punto di vista della ricchezza allelica e della riproducibilità degli amplificati. Inoltre, nel caso dello studio del complesso *U. minor/U. pumila*, i loci microsatelliti sono stati scelti tra quelli che esibiscono polimorfismi in ambedue le specie.

La reazione di PCR è stata assemblata in un volume totale di 20 µl con la seguente miscela di reazione: 11,6 µl acqua distillata, 4 µl 5X PCR buffer, 16 µl MgCl₂ 25 mM (conc. finale 2 mM), 0,4 µl 10 mM dNTP_s (conc. finale 0,2 mM di dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,4 µl 10 µM di ciascun primer (conc. finale 0,2 µM), 0,1 µl 5U/µl goTAQ Flexy™ DNA Polymerase (Promega, conc. finale 0,5 U/reazione) and 1,5 µl DNA genomico di concentrazione media 7,5 ng/µl (11,25 ng/reazione).

LOCUS	SEQUENZA	MOTIVO RIPETUTO	REFERENZA	T_a e MARCATURA
QpZAG 9	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG	(AG) ₁₂	Steinkellner <i>et al.</i> 1997	T _a =55°C, HEX
QpZAG 110	F: GGAGGCTTCCTTCAACCTACT R: GATCTCTTGTGTGCTGTATTT	(AG) ₁₅	Steinkellner <i>et al.</i> 1997	T _a =53°C, FAM
QrZAG 4	F: CGTCTATAAGTTCTTGGGTGA R: GTAACCTATGATGTGATTCTTACTTCA	(GA) ₄₆	Kampfer <i>et al.</i> 1998	T _a =50°C, FAM
QrZAG 7	F: CAACTTGGTGTTCGGATCAA R: GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC	(TC) ₁₇	Kampfer <i>et al.</i> 1998	T _a =51°C, HEX
QrZAG 20	F: CCATTAAGAAGCAGTATTTTGT R: GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA	(TC) ₁₈	Kampfer <i>et al.</i> 1998	T _a =50°C, TAMRA
QrZAG 96	F: CCCAGTCACATCCACTACTGTCC R: GGTGGGAAAAGGAGATCAGA	(TC) ₂₀	Kampfer <i>et al.</i> 1998	T _a =55°C, TAMRA
MSQ 4	F: TCTCCTCTCCCATAAACAGG R: GTTCCTCTATCCAATCAGTAGTGAG	(GA) ₁₇	Dow <i>et al.</i> 1995	T _a =49°C, FAM
MSQ 13	F: TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG R: ACACTCAGACCCACCATTTTCC	(GA) ₁₄	Dow <i>et al.</i> 1995	T _a =53°C, HEX

Tab.3: Loci microsatellite utilizzati per *Quercus cerris*.

LOCUS	SEQUENZA	MOTIVO RIPETUTO	REFERENZA	T_a e MARCATURA
UR 123	F: AGCAATAAACCTTGTGTCGTG R: GAGCTTGCTATGCTTCGCTCTC	(CA) ₄ CG (CA) ₅ (TTA) ₅	Zalapa <i>et al.</i> 2008	HEX
UR 138	F: CTAGAACCCCCTTCGAAACC R: AAAAAAGCCCACACACCTC	(GA) ₈	Zalapa <i>et al.</i> 2008	TAMRA
UR 158	F: TTCTTCATAGGCGCTGAGGT R: TGCACCCTGTCAAAGCTAAA	(TGTA) ₅	Zalapa <i>et al.</i> 2008	FAM
UR 188a	F: AAAACTAACGGTCCCTTCC R: ATTCGCTTCAATTGCGAG	(AC) ₁₅	Zalapa <i>et al.</i> 2008	HEX
Ulmi1-21	F: GCGGTCTTACGTGAGCTTTC R: AAAGAGGCAGACGAAGATGG	(CT) ₁₀	Collada <i>et al.</i> 2004	TAMRA
Ulmi1-165	F: CTCTTCCATTCGTCCTCACC R: GAGGTGCCATAAGCCAAGAA	(CT) ₉	Collada <i>et al.</i> 2004	TAMRA

Tab.4: Loci microsatellite utilizzati per il complesso *Ulmus minor/Ulmus pumila*.

L'amplificazione dei vari loci è stata effettuata secondo il seguente profilo: ad una denaturazione iniziale (94°C per 2 minuti) seguono 35 cicli costituiti da una denaturazione (94°C per 20 secondi), appaiamento (T_a per 20 secondi, Tab. 3) ed estensione (72°C per 20 secondi). Seguono un'estensione finale (72°C per 3 minuti) ed il mantenimento dei prodotti di amplificazione a 4°C per un tempo indefinito. La qualità e la concentrazione degli amplificati è stata saggiata tramite corsa elettroforetica (3 µl di prodotto PCR con 3 µl di GLB 2X) su gel di agarosio al 2% (10V/cm) e confronto con uno standard di peso molecolare compatibile con il

range medio atteso per gli amplificati (circa 100-300 bp): GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas Life Sciences.

La genotipizzazione degli alleli è stata effettuata tramite elettroforesi capillare dei prodotti derivanti dalla PCR con l'utilizzo del sequenziatore automatico megaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences) in corse multiplexate (3 diverse amplificazioni per corsa) e con l'impiego del marcatore di peso molecolare ET-Rox 400™ ladder (General-Healthcare). I differenti amplificati sono stati marcati tramite l'impiego di un primer 5' fluorescente (con uno dei seguenti fluorocromi (6-FAM, HEX, TAMRA, Sigma-Aldrich). La tipizzazione allelica è stata ottenuta tramite l'uso del programma megaBACE™ fragment profiler version 1.2 (Amersham Biosciences).

ELABORAZIONE DEI DATI MOLECOLARI

Per ciascun locus e per ogni popolazione o gruppo considerato i parametri di diversità genetica quali il numero osservato (N_a) ed effettivo (N_e) di alleli, in numero di alleli privati ($N_{a\text{ private}}$), l'eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_e) e le statistiche di Fisher sono stati stimati tramite l'utilizzo del programma Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2000) e del programma GenAlEx 6.0 (Peakall *et al.* 2006).

La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, sempre per ciascun gruppo o popolazione e per tutti i loci, è stata determinata in via preliminare con il programma GenAlEx 6.0, che si basa sul calcolo delle differenze tra le frequenze alleliche osservate ed attese tramite un test del Chi-quadro, e poi ricalcolate con il programma Genpop (<http://genepop.curtin.edu.au/>) che opera sulla base di un test esatto di Fisher tramite un algoritmo basato sulle catene di Markov (Guo *et al.*, 1992).

Il linkage disequilibrium (associazione non casuale tra alleli appartenenti a differenti loci) è stato calcolato con il programma Genetix 4.05 tramite un test esatto di Fisher (test sulle permutazioni in cui vengono considerate alternativamente tutte le coppie di loci e si verifica se esistono delle deviazioni significative dall'ipotesi di assortimento indipendente tra gli alleli ai due loci).

La stima del differenziamento tra le popolazioni è stata effettuata sia tramite la statistica di Wright F_{ST} (Weir *et al*, 1984), che è basata sulla differenza nelle frequenze alleliche), che tramite la statistica R_{ST} (Slatkin, 1995) che tiene conto del livello di differenziamento delle dimensioni degli alleli ed è quindi ottimale considerando l'utilizzo dei microsatelliti come marcatore molecolare.

Il test di Mantel (Mantel, 1967) è stato effettuato per evidenziare un eventuale isolamento da distanza (fenomeno in cui si ha una tendenza all'accoppiamento preferenziale tra individui di popolazioni vicine ed in cui la differenziazione tra le popolazioni è il risultato della deriva genetica). Questo test compara la matrice delle distanze genetiche ($F_{ST}/1-F_{ST}$) con la matrice delle distanze geografiche delle popolazioni (dopo trasformazione logaritmica) e ne calcola il coefficiente di correlazione. Dopo permutazioni casuali tra le righe e le colonne il coefficiente di correlazione viene ricalcolato: se non esiste nessuna relazione tra le due matrici il nuovo coefficiente di correlazione sarà maggiore o minore dell'originale in modo equiprobabile a differenza di quanto avverrà nel caso dell'esistenza di una qualche forma di relazione. In presenza di una forte struttura spaziale questo test evidenzia una significativa correlazione positiva tra la matrice delle distanze genetiche e quella delle distanze geografiche.

Al fine di identificare gruppi geneticamente omogenei nelle popolazioni oggetto di studio è stato utilizzato il programma Structure 2.3.3 (Pritchard *et al*, 2000). Il programma opera sulla base di un metodo di raggruppamento bayesiano tramite un algoritmo che fa uso del metodo Monte Carlo e delle catene di Markov (MCMC) per stimare il valore K (parametro rappresentante il numero di popolazioni geneticamente omogenee di cui è stata fatta un'inferenza). La stima di K è stata effettuata tramite il calcolo di ΔK (la derivata seconda della funzione di verosimiglianza rispetto a K) (Evanno *et al*, 2005). Il valore della moda della distribuzione di ΔK rappresenta il valore più probabile di K. Per tutti i valori di K da 1 a n (n= numero delle popolazioni reali + 3) sono state effettuate 10 simulazioni (parametri adottati per le simulazioni nel programma Structure 2.3.3: "Admixture model", "Correlate allele frequencies between populations", "Burn-in period=10000", "MCMC replications=50000").

Attraverso un'analisi della varianza molecolare (AMOVA), che permette la stima del grado di differenziazione delle popolazioni direttamente dai dati molecolari, la differenziazione tra i gruppi considerati (F_{ST} totale) è stata partizionata tra quella esistente all'interno dei vari gruppi e quella presente tra i gruppi. Il programma GeneA1Ex 6.0 testa la significatività dell'AMOVA effettuando 1000 permutazioni dei dati.

Un'analisi di corrispondenza fattoriale (FCA), basata sulle frequenze alleliche nei differenti loci, è stata effettuata con il programma Genetix al fine di ottenere una più immediata visualizzazione delle prime tre componenti afferenti la variabilità genetica degli individui nello spazio Euclideo.

Al fine di evidenziare l'esistenza di una possibile struttura genetica spaziale i dati molecolari sono stati comparati alle distanze geografiche attraverso un'analisi di autocorrelazione spaziale (ACS) effettuata con il programma GenALEx 6.0. Per differenti classi di distanza il programma effettua una stima del coefficiente di correlazione r attraverso una procedura di permutazione e bootstrap dei dati. Il coefficiente r assume valori compresi nell'intervallo $[-1, +1]$ e vale zero nel caso di assenza di correlazione. I valori stimati di r , dopo le 1000 permutazioni, sono ordinati numericamente e si definisce, sotto un'ipotesi nulla e quindi di assenza di struttura spaziale, un intervallo di confidenza compreso tra il 25-esimo ed il 975-esimo valore degli r ordinati. Per rifiutare l'ipotesi di assenza di correlazione sono considerati statisticamente significativi valori di r che cadono al di fuori degli intervalli di confidenza con una probabilità $P < 0,05$. Il risultato viene rappresentato tramite un autocorrelogramma che mostra la correlazione genetica degli individui in funzione di distanze crescenti evidenziando l'eventuale esistenza di distanze alle quali gli individui sono geneticamente più correlati.

RISULTATI

Quercus cerris in Italia

Variabilità genetica

Un totale di 809 esemplari di *Quercus cerris* sono stati genotipizzati tramite l'utilizzo di otto loci microsatelliti e sono stati identificati 256 distinti alleli. Tutti i loci studiati sono risultati essere altamente polimorfici: il numero di alleli riscontrato per locus, calcolato su tutte le popolazioni, spazia da 20 (locus *QrZAG4*) a 40 (locus *QpZAG9*) con una media di 35 alleli per locus. In nessuno dei loci è stata riscontrata la fissazione per un allele e non si è trovato nessun allele popolazione-specifico. In generale il numero di alleli per locus e per popolazione è considerevolmente costante, tra 10 e 14 con l'eccezione della popolazione VC (8 alleli), ES e VT (15 alleli). La diversità genetica, misurata come eterozigosità di Nei (H_e) è elevata come è frequentemente riscontrato nelle popolazioni di alberi forestali. Con l'eccezione del locus MSQ13, che mostra valori inferiori a 0,003 nelle popolazioni B e BE, i valori di H_e per tutti gli altri loci sono compresi nel range [0,6-0,9]. La media dei valori di H_e mostra invece un range più ristretto con valori compresi tra $H_e=0,65$ (popolazione VC) e $H_e=0,81$ (popolazione MT).

Popolazione	Locus	N_a	N_e	H_o	H_e
CM	QpZAG9	7,000	2,778	0,535	0,640
	QrZAG96	3,000	2,008	0,535	0,502
	MSQ13	4,000	1,181	0,093	0,153
	QpZAG110	21,000	6,824	0,762	0,853
	MSQ4	17,000	10,776	0,659	0,907
	QrZAG4	14,000	6,221	0,795	0,839
	QrZAG7	19,000	11,348	0,900	0,912
	QrZAG20	17,000	12,893	0,553	0,922
	Media	12,750	6,753	0,604	0,716
	Errore st.	2,498	1,607	0,087	0,096
L	QpZAG9	10,000	2,748	0,600	0,636
	QrZAG96	4,000	1,641	0,300	0,391
	MSQ13	4,000	1,545	0,207	0,353
	QpZAG110	16,000	10,286	0,767	0,903
	MSQ4	16,000	7,059	0,833	0,858
	QrZAG4	13,000	5,828	0,692	0,828
	QrZAG7	15,000	7,502	0,679	0,867
	QrZAG20	15,000	9,633	0,235	0,896
	Media	11,625	5,780	0,539	0,716
	Errore st.	1,802	1,225	0,089	0,081

Tab. x: N_a= numero di alleli, N_e= numero effettivo di alleli, H_o= eterozigotità osservata,

ES	QpZAG9	11,000	1,852	0,455	0,460
	QrZAG96	6,000	2,911	0,341	0,657
	MSQ13	3,000	1,147	0,091	0,128
	QpZAG110	22,000	10,826	0,667	0,908
	MSQ4	19,000	10,595	0,762	0,906
	QrZAG4	19,000	5,779	0,773	0,827
	QrZAG7	22,000	13,646	0,930	0,927
	QrZAG20	18,000	11,524	0,455	0,913
	Media	15,000	7,285	0,559	0,716
	Errore st.	2,605	1,745	0,097	0,102
VT	QpZAG9	13,000	4,995	0,563	0,800
	QrZAG96	12,000	3,886	0,500	0,743
	MSQ13	9,000	1,592	0,121	0,372
	QpZAG110	15,000	9,267	0,719	0,892
	MSQ4	20,000	12,481	0,710	0,920
	QrZAG4	16,000	8,055	0,778	0,876
	QrZAG7	14,000	10,453	0,893	0,904
	QrZAG20	22,000	12,552	0,552	0,920
	Media	15,125	7,910	0,604	0,803
	Errore st.	1,493	1,435	0,083	0,066
BF	QpZAG9	12,000	3,009	0,552	0,668
	QrZAG96	4,000	2,753	0,586	0,637
	MSQ13	3,000	1,439	0,033	0,305
	QpZAG110	15,000	8,082	0,679	0,876
	MSQ4	17,000	10,012	0,655	0,900
	QrZAG4	9,000	4,796	0,704	0,791
	QrZAG7	13,000	7,097	0,966	0,859
	QrZAG20	14,000	6,050	0,483	0,835
	Media	10,875	5,405	0,582	0,734
	Errore st.	1,807	1,040	0,093	0,070
BE	QpZAG9	10,000	2,421	0,500	0,587
	QrZAG96	4,000	1,780	0,471	0,438
	MSQ13	2,000	1,030	0,029	0,029
	QpZAG110	16,000	7,877	0,613	0,873
	MSQ4	17,000	10,371	0,879	0,904
	QrZAG4	13,000	6,077	0,750	0,835
	QrZAG7	17,000	11,446	0,941	0,913
	QrZAG20	18,000	11,918	0,735	0,916
	Media	12,125	6,615	0,615	0,687
	Errore st.	2,199	1,579	0,102	0,113
CF	QpZAG9	9,000	2,158	0,600	0,537
	QrZAG96	5,000	1,901	0,567	0,474
	MSQ13	4,000	1,229	0,167	0,186
	QpZAG110	15,000	8,654	0,767	0,884
	MSQ4	17,000	12,414	0,800	0,919
	QrZAG4	17,000	12,368	0,828	0,919
	QrZAG7	23,000	11,362	0,929	0,912
	QrZAG20	18,000	13,755	0,741	0,927
	Media	13,500	7,980	0,675	0,720
	Errore st.	2,390	1,893	0,084	0,100

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
B	QpZAG9	15,000	2,772	0,639	0,639
	QrZAG96	7,000	2,165	0,389	0,538
	MSQ13	6,000	1,425	0,167	0,298
	QpZAG110	15,000	11,115	0,588	0,910
	MSQ4	20,000	9,438	0,719	0,894
	QrZAG4	12,000	3,798	0,714	0,737
	QrZAG7	17,000	9,074	0,829	0,890
	QrZAG20	19,000	8,037	0,424	0,876
	Media	13,875	5,978	0,559	0,723
	Errore st.	1,837	1,353	0,077	0,078
A	QpZAG9	8,000	2,344	0,567	0,573
	QrZAG96	3,000	2,359	0,633	0,576
	MSQ13	2,000	1,034	0,033	0,033
	QpZAG110	15,000	8,995	0,759	0,889
	MSQ4	18,000	13,235	0,700	0,924
	QrZAG4	11,000	5,263	0,800	0,810
	QrZAG7	14,000	7,469	0,933	0,866
	QrZAG20	14,000	10,526	0,867	0,905
	Media	10,625	6,403	0,661	0,697
	Errore st.	2,052	1,550	0,099	0,107
D	QpZAG9	9,000	1,607	0,367	0,378
	QrZAG96	4,000	2,707	0,667	0,631
	MSQ13	6,000	1,480	0,267	0,324
	QpZAG110	16,000	8,295	0,800	0,879
	MSQ4	19,000	13,244	0,897	0,924
	QrZAG4	17,000	9,259	0,600	0,892
	QrZAG7	21,000	13,517	0,893	0,926
	QrZAG20	17,000	8,859	0,536	0,887
	Media	13,625	7,371	0,628	0,730
	Errore st.	2,251	1,735	0,083	0,089
LI	QpZAG9	11,000	2,726	0,655	0,633
	QrZAG96	8,000	2,995	0,433	0,666
	MSQ13	7,000	1,731	0,133	0,422
	QpZAG110	17,000	8,340	0,643	0,880
	MSQ4	16,000	6,054	0,536	0,835
	QrZAG4	13,000	5,902	0,633	0,831
	QrZAG7	16,000	8,738	0,900	0,886
	QrZAG20	14,000	11,521	0,724	0,913
	Media	12,750	6,001	0,582	0,758
	Errore st.	1,333	1,206	0,080	0,060
BR	QpZAG9	8,000	1,850	0,310	0,460
	QrZAG96	4,000	2,657	0,690	0,624
	MSQ13	2,000	1,105	0,100	0,095
	QpZAG110	16,000	10,651	0,633	0,906
	MSQ4	22,000	14,876	0,867	0,933
	QrZAG4	20,000	12,329	0,767	0,919
	QrZAG7	20,000	12,000	0,933	0,917
	QrZAG20	17,000	8,000	0,667	0,875
	Media	13,625	7,934	0,621	0,716
	Errore st.	2,764	1,904	0,099	0,108

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
CV	QpZAG9	12,000	2,106	0,529	0,525
	QrZAG96	6,000	2,408	0,559	0,585
	MSQ13	6,000	1,508	0,206	0,337
	QpZAG110	18,000	12,446	0,848	0,920
	MSQ4	22,000	13,535	0,968	0,926
	QrZAG4	15,000	7,787	0,690	0,872
	QrZAG7	18,000	7,396	0,750	0,865
	QrZAG20	18,000	11,574	0,440	0,914
	Media	14,375	7,345	0,624	0,743
	Errore st.	2,087	1,734	0,086	0,080
MA	QpZAG9	14,000	2,538	0,550	0,606
	QrZAG96	6,000	3,296	0,525	0,697
	MSQ13	5,000	1,552	0,200	0,356
	QpZAG110	19,000	10,159	0,575	0,902
	MSQ4	22,000	14,747	0,525	0,932
	QrZAG4	12,000	4,457	0,750	0,776
	QrZAG7	17,000	10,667	0,775	0,906
	QrZAG20	16,000	7,978	0,605	0,875
	Media	13,875	6,924	0,563	0,756
	Errore st.	2,117	1,659	0,062	0,070
FI	QpZAG9	5,000	1,883	0,500	0,469
	QrZAG96	5,000	2,568	0,500	0,611
	MSQ13	3,000	1,275	0,207	0,216
	QpZAG110	10,000	5,904	0,769	0,831
	MSQ4	13,000	7,543	0,655	0,867
	QrZAG4	18,000	10,481	0,654	0,905
	QrZAG7	13,000	8,048	0,793	0,876
	QrZAG20	15,000	5,297	0,520	0,811
	Media	10,250	5,375	0,575	0,698
	Errore st.	1,916	1,158	0,067	0,087
MT	QpZAG9	9,000	3,366	0,419	0,703
	QrZAG96	9,000	4,255	0,667	0,765
	MSQ13	8,000	2,472	0,125	0,595
	QpZAG110	22,000	16,820	0,483	0,941
	MSQ4	17,000	7,200	0,533	0,861
	QrZAG4	13,000	6,649	0,750	0,850
	QrZAG7	14,000	10,723	0,844	0,907
	QrZAG20	6,000	5,556	0,200	0,820
	Media	12,250	7,130	0,503	0,805
	Errore st.	1,887	1,656	0,089	0,040
SA	QpZAG9	7,000	2,446	0,143	0,591
	QrZAG96	5,000	3,230	0,581	0,690
	MSQ13	12,000	3,760	0,214	0,734
	QpZAG110	14,000	9,587	0,429	0,896
	MSQ4	14,000	8,082	0,393	0,876
	QrZAG4	13,000	7,683	0,909	0,870
	QrZAG7	18,000	9,851	0,889	0,898
	QrZAG20	0,000	0,000	0,000	0,000
	Media	10,375	5,580	0,445	0,694
	Errore st.	2,078	1,301	0,118	0,107

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
MG	QpZAG9	13,000	2,735	0,450	0,634
	QrZAG96	6,000	3,513	0,697	0,715
	MSQ13	4,000	1,123	0,029	0,110
	QpZAG110	12,000	4,518	0,568	0,779
	MSQ4	15,000	5,146	0,750	0,806
	QrZAG4	11,000	6,382	0,757	0,843
	QrZAG7	7,000	4,278	0,750	0,766
	QrZAG20	13,000	4,829	0,795	0,793
	Media	10,125	4,066	0,599	0,681
	Errore st.	1,394	0,568	0,091	0,085
BS	QpZAG9	12,000	1,784	0,378	0,439
	QrZAG96	10,000	3,129	0,629	0,680
	MSQ13	5,000	1,380	0,056	0,275
	QpZAG110	14,000	6,790	0,564	0,853
	MSQ4	18,000	9,316	0,763	0,893
	QrZAG4	11,000	4,298	0,865	0,767
	QrZAG7	14,000	10,490	0,872	0,905
	QrZAG20	16,000	8,665	0,568	0,885
	Media	12,500	5,731	0,587	0,712
	Errore st.	1,414	1,258	0,096	0,083
CO	QpZAG9	12,000	1,700	0,400	0,412
	QrZAG96	4,000	2,500	0,500	0,600
	MSQ13	7,000	1,397	0,263	0,284
	QpZAG110	23,000	8,067	0,737	0,876
	MSQ4	22,000	15,211	0,882	0,934
	QrZAG4	16,000	4,295	0,750	0,767
	QrZAG7	13,000	7,645	0,828	0,869
	QrZAG20	19,000	12,462	0,750	0,920
	Media	14,500	6,660	0,639	0,708
	Errore st.	2,413	1,817	0,079	0,088
BA	QpZAG9	9,000	2,554	0,531	0,608
	QrZAG96	5,000	2,596	0,607	0,615
	MSQ13	5,000	1,586	0,433	0,369
	QpZAG110	17,000	12,245	0,767	0,918
	MSQ4	15,000	7,477	0,900	0,866
	QrZAG4	16,000	3,220	0,719	0,689
	QrZAG7	14,000	8,621	0,920	0,884
	QrZAG20	17,000	12,587	0,600	0,921
	Media	12,250	6,361	0,685	0,734
	Errore st.	1,820	1,587	0,061	0,070
MD	QpZAG9	8,000	1,941	0,481	0,485
	QrZAG96	4,000	3,005	0,500	0,667
	MSQ13	3,000	1,164	0,050	0,141
	QpZAG110	21,000	11,223	0,706	0,911
	MSQ4	0,000	0,000	0,000	0,000
	QrZAG4	15,000	3,761	0,903	0,734
	QrZAG7	15,000	7,256	0,825	0,862
	QrZAG20	18,000	10,182	0,714	0,902
	Media	10,500	4,817	0,522	0,588
	Errore st.	2,745	1,494	0,120	0,124

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
VC	QpZAG9	7,000	2,492	0,621	0,599
	QrZAG96	3,000	2,415	0,575	0,586
	MSQ13	2,000	1,202	0,185	0,168
	QpZAG110	15,000	7,448	0,556	0,866
	MSQ4	0,000	0,000	0,000	0,000
	QrZAG4	8,000	3,540	0,871	0,717
	QrZAG7	9,000	5,895	1,000	0,830
	QrZAG20	14,000	4,676	0,531	0,786
	Media	7,250	3,458	0,542	0,569
	Errore st.	1,925	0,870	0,115	0,113

Tab.1: Variabilità genetica in Cerro. N_a = numero di alleli, N_e = numero effettivo di alleli, H_0 = eterozigosità osservata, H_E = eterozigosità attesa. Media per ciascun locus in tutte le popolazioni.

Popolazione		Na	Ne	Ho	He
CM	Media	12,750	6,753	0,604	0,716
	Errore st.	2,498	1,607	0,087	0,096
L	Media	11,625	5,780	0,539	0,716
	Errore st.	1,802	1,225	0,089	0,081
ES	Media	15,000	7,285	0,559	0,716
	Errore st.	2,605	1,745	0,097	0,102
VT	Media	15,125	7,910	0,604	0,803
	Errore st.	1,493	1,435	0,083	0,066
BF	Media	10,875	5,405	0,582	0,734
	Errore st.	1,807	1,040	0,093	0,070
BE	Media	12,125	6,615	0,615	0,687
	Errore st.	2,199	1,579	0,102	0,113
CF	Media	13,500	7,980	0,675	0,720
	Errore st.	2,390	1,893	0,084	0,100
B	Media	13,875	5,978	0,559	0,723
	Errore st.	1,837	1,353	0,077	0,078
A	Media	10,625	6,403	0,661	0,697
	Errore st.	2,052	1,550	0,099	0,107
D	Media	13,625	7,371	0,628	0,730
	Errore st.	2,251	1,735	0,083	0,089
LI	Media	12,750	6,001	0,582	0,758
	Errore st.	1,333	1,206	0,080	0,060
BR	Media	13,625	7,934	0,621	0,716
	Errore st.	2,764	1,904	0,099	0,108
CV	Media	14,375	7,345	0,624	0,743
	Errore st.	2,087	1,734	0,086	0,080
MA	Media	13,875	6,924	0,563	0,756
	Errore st.	2,117	1,659	0,062	0,070
FI	Media	10,250	5,375	0,575	0,698
	Errore st.	1,916	1,158	0,067	0,087
MT	Media	12,250	7,130	0,503	0,805
	Errore st.	1,887	1,656	0,089	0,040
SA	Media	10,375	5,580	0,445	0,694
	Errore st.	2,078	1,301	0,118	0,107
MG	Media	10,125	4,066	0,599	0,681
	Errore st.	1,394	0,568	0,091	0,085
BS	Media	12,500	5,731	0,587	0,712
	Errore st.	1,414	1,258	0,096	0,083
CO	Media	14,500	6,660	0,639	0,708
	Errore st.	2,413	1,817	0,079	0,088
BA	Media	12,250	6,361	0,685	0,734
	Errore st.	1,820	1,587	0,061	0,070
MD	Media	10,500	4,817	0,522	0,588
	Errore st.	2,745	1,494	0,120	0,124
VC	Media	7,250	3,458	0,542	0,569
	Errore st.	1,925	0,870	0,115	0,113

Tab.2: Variabilità genetica in Cerro. N_a = numero di alleli, N_e = numero effettivo di alleli, H_o = eterozigotità osservata, H_E = eterozigotità attesa. Media per ciascuna popolazione.

Tutte lo pop.		Na	Ne	Ho	He
	Media	12,337	6,298	0,587	0,713
	Errore st.	0,429	0,303	0,018	0,018

Tab.3: Variabilità genetica in Cerro. N_a = numero di alleli, N_e = numero effettivo di alleli, H_0 = eterozigotà osservata, H_E = eterozigotà attesa. Media per tutti i loci e tutte le popolazioni.

	QpZAG9	QrZAG96	MSQ13	QpZAG110	MSQ4	QrZAG4	QrZAG7	QrZAG20
Ho	0,493	0,541	0,148	0,669	0,669	0,759	0,868	0,552
se	0,025	0,022	0,020	0,023	0,053	0,017	0,017	0,043
He	0,569	0,612	0,273	0,885	0,817	0,822	0,885	0,844
se	0,021	0,020	0,035	0,007	0,054	0,014	0,007	0,039

Tab.4: Variabilità genetica in Cerro. H_0 = eterozigotà osservata, H_E = eterozigotà attesa.

Media per locus su tutte le popolazioni.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato verificato, per tutti i loci e tutte le popolazioni, tramite un test del Chi quadro ed il calcolo delle deviazioni da zero del parametro F_{IS} sotto ipotesi nulla. I valori di F_{IS} si discostano significativamente da zero per almeno due loci su otto per tutte le popolazioni considerate. Le popolazioni MT e BS non hanno nessun locus all'equilibrio. Nella maggior parte dei casi le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg sono associate con valori positivi di F_{IS} mentre valori negativi del parametro sono stati riscontrati solamente in sei casi (due per le popolazioni BR e VC e uno per le popolazioni BS e MD).

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif. (Chi quadro)	Signif. (Fisher)
CM	QpZAG9	21	19,271	0,568	ns	ns
	QrZAG96	3	2,421	0,490	ns	ns
	MSQ13	6	31,496	0,000	***	***
	QpZAG110	210	165,812	0,989	ns	***
	MSQ4	136	220,827	0,000	***	***
	QrZAG4	91	240,827	0,000	***	***
	QrZAG7	171	274,838	0,000	***	ns
	QrZAG20	136	233,433	0,000	***	***
L	QpZAG9	45	64,932	0,027	*	ns
	QrZAG96	6	31,791	0,000	***	***
	MSQ13	6	27,124	0,000	***	***
	QpZAG110	120	113,470	0,650	ns	ns
	MSQ4	120	91,974	0,973	ns	ns
	QrZAG4	78	166,970	0,000	***	***
	QrZAG7	105	143,588	0,007	**	***
	QrZAG20	105	202,938	0,000	***	***
ES	QpZAG9	55	27,986	0,999	ns	ns
	QrZAG96	15	128,914	0,000	***	***
	MSQ13	3	5,857	0,119	ns	ns
	QpZAG110	231	235,294	0,409	ns	***
	MSQ4	171	234,127	0,001	***	***
	QrZAG4	171	291,306	0,000	***	***
	QrZAG7	231	280,084	0,015	*	ns
	QrZAG20	153	317,165	0,000	***	***
VT	QpZAG9	78	206,503	0,000	***	***
	QrZAG96	66	163,202	0,000	***	***
	MSQ13	36	197,414	0,000	***	***
	QpZAG110	105	124,785	0,091	ns	***
	MSQ4	190	288,283	0,000	***	***
	QrZAG4	120	162,396	0,006	**	ns
	QrZAG7	91	91,292	0,472	ns	ns
	QrZAG20	231	354,215	0,000	***	***

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif. (Chi quadro)	Signif. (Fisher)
BF	QpZAG9	66	116,555	0,000	***	ns
	QrZAG96	6	3,183	0,786	ns	ns
	MSQ13	3	30,012	0,000	***	***
	QpZAG110	105	121,702	0,127	ns	***
	MSQ4	136	173,984	0,015	*	***
	QrZAG4	36	70,732	0,000	***	***
	QrZAG7	78	80,939	0,388	ns	ns
	QrZAG20	91	172,715	0,000	***	***
BE	QpZAG9	45	128,597	0,000	***	***
	QrZAG96	6	4,321	0,633	ns	ns
	MSQ13	1	0,008	0,931	ns	-
	QpZAG110	120	167,779	0,003	**	***
	MSQ4	136	129,364	0,644	ns	ns
	QrZAG4	78	163,092	0,000	***	***
	QrZAG7	136	133,746	0,539	ns	ns
	QrZAG20	153	230,256	0,000	***	***
CF	QpZAG9	36	35,550	0,490	ns	ns
	QrZAG96	10	10,604	0,389	ns	ns
	MSQ13	6	8,868	0,181	ns	ns
	QpZAG110	105	100,924	0,594	ns	ns
	MSQ4	136	185,527	0,003	**	***
	QrZAG4	136	198,559	0,000	***	***
	QrZAG7	253	345,944	0,000	***	***
	QrZAG20	153	213,626	0,001	***	***
B	QpZAG9	105	179,276	0,000	***	ns
	QrZAG96	21	113,359	0,000	***	***
	MSQ13	15	108,360	0,000	***	***
	QpZAG110	105	167,468	0,000	***	***
	MSQ4	190	270,000	0,000	***	***
	QrZAG4	66	154,635	0,000	***	***
	QrZAG7	136	99,633	0,992	ns	ns
	QrZAG20	171	302,442	0,000	***	***
A	QpZAG9	28	53,583	0,003	**	ns
	QrZAG96	3	2,185	0,535	ns	ns
	MSQ13	1	0,009	0,926	ns	-
	QpZAG110	105	129,935	0,050	*	***
	MSQ4	153	198,346	0,008	**	***
	QrZAG4	55	119,856	0,000	***	***
	QrZAG7	91	128,176	0,006	**	ns
	QrZAG20	91	146,121	0,000	***	***
D	QpZAG9	36	34,292	0,550	ns	ns
	QrZAG96	6	8,763	0,187	ns	ns
	MSQ13	15	33,946	0,003	**	***
	QpZAG110	120	230,110	0,000	***	***
	MSQ4	171	168,437	0,541	ns	ns
	QrZAG4	136	200,434	0,000	***	***
	QrZAG7	210	227,956	0,188	ns	ns
	QrZAG20	136	215,835	0,000	***	***

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif. (Chi quadro)	Signif. (Fisher)
LI	QpZAG9	55	101,413	0,000	***	ns
	QrZAG96	28	74,624	0,000	***	***
	MSQ13	21	150,133	0,000	***	***
	QpZAG110	136	246,551	0,000	***	***
	MSQ4	120	197,649	0,000	***	***
	QrZAG4	78	181,249	0,000	***	***
	QrZAG7	120	195,406	0,000	***	***
	QrZAG20	91	165,947	0,000	***	***
BR	QpZAG9	28	69,870	0,000	***	***
	QrZAG96	6	12,206	0,058	ns	***
	MSQ13	1	0,083	0,773	ns	ns
	QpZAG110	120	122,865	0,410	ns	***
	MSQ4	231	270,850	0,037	*	ns
	QrZAG4	190	293,823	0,000	***	***
	QrZAG7	190	231,997	0,020	*	***
	QrZAG20	136	168,517	0,031	*	***
CV	QpZAG9	66	148,072	0,000	***	ns
	QrZAG96	15	102,584	0,000	***	***
	MSQ13	15	68,551	0,000	***	***
	QpZAG110	153	144,670	0,672	ns	***
	MSQ4	231	227,269	0,557	ns	ns
	QrZAG4	105	221,493	0,000	***	***
	QrZAG7	153	162,906	0,277	ns	ns
	QrZAG20	153	263,341	0,000	***	***
MA	QpZAG9	91	191,231	0,000	***	***
	QrZAG96	15	97,742	0,000	***	***
	MSQ13	10	51,129	0,000	***	***
	QpZAG110	171	258,822	0,000	***	***
	MSQ4	231	379,529	0,000	***	***
	QrZAG4	66	183,134	0,000	***	***
	QrZAG7	136	166,083	0,041	*	ns
	QrZAG20	120	166,789	0,003	**	***
FI	QpZAG9	10	1,156	1,000	ns	ns
	QrZAG96	10	33,100	0,000	***	ns
	MSQ13	3	8,998	0,029	*	ns
	QpZAG110	45	45,141	0,466	ns	ns
	MSQ4	78	110,160	0,010	**	***
	QrZAG4	153	266,452	0,000	***	***
	QrZAG7	78	157,788	0,000	***	***
	QrZAG20	105	195,177	0,000	***	***
MT	QpZAG9	36	144,380	0,000	***	***
	QrZAG96	36	101,875	0,000	***	***
	MSQ13	28	97,529	0,000	***	***
	QpZAG110	231	388,084	0,000	***	***
	MSQ4	136	210,648	0,000	***	***
	QrZAG4	78	109,151	0,011	*	***
	QrZAG7	91	108,820	0,098	ns	***
	QrZAG20	15	25,000	0,050	*	***

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif. (Chi quadro)	Signif. (Fisher)
SA	QpZAG9	21	118,707	0,000	***	***
	QrZAG96	10	9,728	0,465	ns	ns
	MSQ13	66	220,858	0,000	***	***
	QpZAG110	91	153,411	0,000	***	***
	MSQ4	91	216,556	0,000	***	***
	QrZAG4	78	95,368	0,088	ns	ns
	QrZAG7	153	158,764	0,358	ns	ns
	QrZAG20	-				-
MG	QpZAG9	78	258,482	0,000	***	***
	QrZAG96	15	20,432	0,156	ns	ns
	MSQ13	6	105,000	0,000	***	***
	QpZAG110	66	126,201	0,000	***	***
	MSQ4	105	134,759	0,027	*	***
	QrZAG4	55	72,813	0,054	ns	***
	QrZAG7	21	24,049	0,291	ns	ns
	QrZAG20	78	153,991	0,000	***	***
BS	QpZAG9	66	195,185	0,000	***	***
	QrZAG96	45	147,023	0,000	***	***
	MSQ13	10	91,223	0,000	***	***
	QpZAG110	91	234,017	0,000	***	***
	MSQ4	153	172,112	0,138	ns	***
	QrZAG4	55	62,228	0,235	ns	***
	QrZAG7	91	139,727	0,001	***	***
	QrZAG20	120	231,480	0,000	***	***
CO	QpZAG9	66	134,276	0,000	***	ns
	QrZAG96	6	8,669	0,193	ns	ns
	MSQ13	21	17,025	0,710	ns	ns
	QpZAG110	253	281,951	0,102	ns	***
	MSQ4	231	218,781	0,708	ns	ns
	QrZAG4	120	206,800	0,000	***	***
	QrZAG7	78	58,884	0,948	ns	ns
	QrZAG20	171	184,393	0,229	ns	***
BA	QpZAG9	36	36,912	0,427	ns	ns
	QrZAG96	10	56,579	0,000	***	ns
	MSQ13	10	2,295	0,994	ns	ns
	QpZAG110	136	170,217	0,025	*	***
	MSQ4	105	104,722	0,489	ns	ns
	QrZAG4	120	136,249	0,147	ns	ns
	QrZAG7	91	65,858	0,978	ns	ns
	QrZAG20	136	174,851	0,014	*	***
MD	QpZAG9	28	61,099	0,000	***	ns
	QrZAG96	6	12,280	0,056	ns	***
	MSQ13	3	20,015	0,000	***	***
	QpZAG110	210	263,925	0,007	**	***
	MSQ4	-				-
	QrZAG4	105	180,437	0,000	***	***
	QrZAG7	105	174,527	0,000	***	***
	QrZAG20	153	178,952	0,074	ns	***

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif. (Chi quadro)	Signif. (Fisher)
VC	QpZAG9	21	10,491	0,972	ns	ns
	QrZAG96	3	20,089	0,000	***	***
	MSQ13	1	0,281	0,596	ns	ns
	QpZAG110	105	186,698	0,000	***	***
	MSQ4	-				-
	QrZAG4	28	43,137	0,034	*	***
	QrZAG7	36	56,926	0,015	*	***
	QrZAG20	91	134,407	0,002	**	***

Tab.5: test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti i loci in tutte le popolazioni.

Linkage disequilibrium

L'associazione non casuale degli alleli ai differenti loci (linkage disequilibrium) è stata determinata con il programma Genetix 4.05. Considerando che il numero di coppie alleliche, ottenibile utilizzando otto loci, è ventotto è ragionevole aspettarsi uno o due falsi positivi per popolazione. Pertanto, non considerando le popolazioni che mostrano soltanto una o due coppie di loci non all'equilibrio, solamente nove popolazioni mostrano un discostamento dall'equilibrio al livello di probabilità del 5%: CM, B, LI, MA, MG, BS, CO, BA e MD. Tra queste la popolazione MA è caratterizzata dalla presenza di dieci coppie alleliche non all'equilibrio.

Coppia allelica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
QpZAG9- QrZAG96	72%	52%	79%	0%	6%	38%	45%	1%	42%	59%	2%	16%
QpZAG9- MSQ13	78%	92%	54%	10%	93%	61%	86%	0%	100%	47%	2%	76%
QpZAG9-QpZAG110	51%	9%	32%	38%	1%	80%	49%	64%	41%	43%	3%	7%
QpZAG9- MSQ4	91%	59%	100%	38%	99%	80%	81%	1%	43%	15%	7%	56%
QpZAG9- QrZAG4	23%	97%	38%	22%	55%	49%	18%	13%	43%	38%	87%	88%
QpZAG9- QrZAG7	28%	76%	92%	6%	98%	61%	61%	70%	83%	99%	68%	83%
QpZAG9- QrZAG20	89%	85%	83%	86%	14%	15%	5%	89%	15%	68%	56%	40%
QrZAG96- MSQ13	13%	24%	4%	8%	54%	57%	100%	1%	100%	8%	2%	16%
QrZAG96-QpZAG110	67%	92%	44%	49%	20%	52%	36%	37%	26%	75%	12%	6%
QrZAG96- MSQ4	34%	83%	9%	48%	2%	56%	77%	25%	19%	13%	35%	56%
QrZAG96- QrZAG4	0%	9%	89%	19%	60%	57%	62%	45%	94%	11%	92%	12%
QrZAG96- QrZAG7	18%	65%	70%	10%	71%	11%	90%	73%	10%	96%	58%	25%
QrZAG96- QrZAG20	89%	98%	87%	26%	45%	17%	13%	68%	75%	70%	73%	77%
MSQ13-QpZAG110	81%	44%	85%	41%	41%	81%	9%	60%	34%	49%	7%	21%
MSQ13-MSQ4	0%	80%	34%	46%	32%	1%	26%	10%	87%	48%	12%	15%
MSQ13- QrZAG4	3%	84%	42%	29	60%	29%	13%	1%	11%	69%	67%	5%
MSQ13- QrZAG7	2%	80%	63%	8	78%	54%	67%	32%	36%	81%	56%	43%
MSQ13- QrZAG20	86%	3%	22%	66%	97%	73%	98%	49%	31%	57%	26%	85%
QpZAG110- MSQ4	70%	39%	53%	87%	96%	76%	32%	75%	73%	82%	6%	88%
QpZAG110- QrZAG4	94%	33%	96%	6%	21%	71%	16%	67%	4%	25%	31%	18%
QpZAG110- QrZAG7	3%	50%	37%	57%	78%	95%	24%	41%	56%	15%	24%	16%
QpZAG110- QrZAG20	88%	36%	46%	46%	79%	26%	98%	73%	69%	16%	65%	30%
MSQ4- QrZAG7	2%	58%	72%	54%	53%	29%	71%	18%	43%	76%	24%	45%
MSQ4- QrZAG7	20%	20%	93%	77%	23%	89%	52%	36%	85%	94%	11%	42%
MSQ4- QrZAG20	32%	44%	57%	54%	20%	68%	60%	45%	3%	65%	33%	77%
QrZAG4- QrZAG7	1%	6%	18%	60%	10%	45%	39%	1%	26%	72%	1%	16%
QrZAG4- QrZAG20	7%	8%	59%	88%	18%	14%	66%	41%	87%	15%	15%	86%
QrZAG7- QrZAG20	28%	21%	11%	91%	31%	27%	76%	49%	8%	26%	27%	87%

Coppia allelica	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Pop. Raggr.
QpZAG9- QrZAG96	0%	2%	22%	73%	0%	3%	0%	66%	14%	0%	59%	0%
QpZAG9- MSQ13	8%	0%	46%	78%	80%	36%	21%	100%	78%	0%	50%	3%
QpZAG9-QpZAG110	9%	7%	69%	79%	96%	39%	4%	0%	6%	5%	57%	17%
QpZAG9- MSQ4	10%	77%	69%	19%	28%	19%	0%	43%	18%	-	-	3%
QpZAG9- QrZAG4	10%	0%	12%	79%	20%	7%	7%	39%	92%	3%	92%	29%
QpZAG9- QrZAG7	20%	55%	75%	87%	42%	64%	21%	78%	5%	16%	57%	34%
QpZAG9- QrZAG20	16%	60%	27%	80%	-	58%	11%	6%	28%	0%	79%	25%
QrZAG96- MSQ13	0%	0%	26%	50%	66%	64%	18%	0%	31%	1%	87%	0%
QrZAG96-QpZAG110	15%	2%	3%	36%	83%	3%	6%	32%	42%	9%	4%	2%
QrZAG96- MSQ4	5%	73%	16%	35%	8%	3%	0%	98%	62%	-	-	18%
QrZAG96- QrZAG4	14%	0%	76%	58%	6%	67%	0%	29%	18%	1%	90%	22%
QrZAG96- QrZAG7	38%	55%	96%	2%	86%	28%	95%	36%	4%	5%	17%	13%
QrZAG96- QrZAG20	5%	39%	23%	81%	-	71%	2%	72%	4%	56%	16%	88%
MSQ13-QpZAG110	54%	0%	46%	81%	98%	64%	16%	77%	4%	5%	69%	37%
MSQ13-MSQ4	0%	69%	81%	52%	24%	7%	23%	76%	15%	-	-	25%
MSQ13- QrZAG4	89%	0%	16%	99%	48%	22%	61%	95%	4%	7%	71%	18%
MSQ13- QrZAG7	35%	40%	96%	0%	60%	33%	50%	6%	94%	14%	59%	17%
MSQ13- QrZAG20	63%	51%	64%	86%	-	72%	14%	84%	6%	25%	89%	100%
QpZAG110- MSQ4	75%	54%	65%	45%	33%	51%	12%	95%	4%	-	-	100%
QpZAG110- QrZAG4	13%	1%	86%	31%	61%	55%	55%	67%	54%	9%	89%	71%
QpZAG110- QrZAG7	48%	16%	98%	24%	14%	0%	35%	41%	12%	29%	17%	73%
QpZAG110- QrZAG20	37%	20%	15%	76%	-	41%	8%	55%	36%	85%	97%	23%
MSQ4- QrZAG7	94%	76%	63%	54%	12%	1%	6%	49%	5%	-	-	14%
MSQ4- QrZAG7	32%	41%	0%	32%	92%	19%	32%	89%	38%	-	-	27%
MSQ4- QrZAG20	78%	3%	82%	99%	-	11%	50%	0%	8%	-	-	42%
QrZAG4- QrZAG7	2%	16%	41%	27%	98%	16%	81%	68%	67%	17%	31%	0%
QrZAG4- QrZAG20	24%	44%	31%	67%	-	44%	23%	89%	15%	37%	57%	12%
QrZAG7- QrZAG20	78%	38%	49%	97%	-	12%	60%	97%	4%	69%	46%	26%

Tab.6: test per il linkage disequilibrium per tutte le popolazioni.

In rosso le coppie alleliche non all'equilibrio con significatività del 5%.

Statistiche di Fisher

Le statistiche di Fisher sono state calcolate per tutti i loci e per tutte le popolazioni. Si riscontra un moderato ma significativo livello di inbreeding $F_{IS} = 0.188$ ($0.112 \leq F_{IS} \leq 0.268$) associato ad un valore di F_{ST} abbastanza basso ma statisticamente significativo ($0.038 \leq F_{ST} \leq 0.195$). Il valore di F_{ST} pari a 0.267 ($0.172 \leq F_{IT} \leq 0.396$). E' stato stimato che circa il 10% della varianza genetica può essere attribuito alla differenziazione tra le popolazioni. Anche il valore di R_{ST} è risultato significativo e molto vicino al parametro F_{ST} ($0.100 \leq R_{ST} \leq 0.139$).

Per tutte le coppie di popolazioni la divergenza genetica è stata misurata utilizzando sia il parametro F_{ST} che il parametro R_{ST} (Tab.7). La significatività del valore numerico determinato è stata testata tramite una procedura di permutazione: tutti i valori dei sue parametri differiscono significativamente da zero con sole tre eccezioni (coppie BF-LI, A-CV, MT-BA) relativamente al solo parametro F_{ST} . Il massimo valore tra le coppie di F_{ST} è pari a 0,24 ed è stato riscontrato tra le popolazioni BE e VC mentre il massimo valore di R_{ST} , 0.35, è quello tra le popolazioni CM e MG. La popolazione VC è particolarmente interessante in quanto mostra valori di F_{ST} maggiori di 0,20 in 12 delle 22 comparazioni a coppia effettuate. E' interessante notare come i valori delle coppie R_{ST} sono solitamente più elevati di quelli delle coppie F_{ST} corrispondenti con poche eccezioni.

	CM	L	ES	VT	BF	BE	CF	B	A	D	LI	BR
CM		0,0156	0,0228	0,0431	0,0528	0,0126	0,0781	0,0434	0,0117	0,0140	0,0560	0,0561
L	<i>0,0130</i>		0,0277	0,0421	0,0553	0,0232	0,0740	0,0493	0,0120	0,0132	0,0575	0,0653
ES	<i>0,0064</i>	<i>0,0139</i>		0,0451	0,0494	0,0116	0,0501	0,0336	0,0256	0,0150	0,0472	0,0298
VT	0,0783	<i>0,0828</i>	<i>0,0339</i>		0,0288	0,0579	0,0417	0,0641	0,0440	0,0401	0,0316	0,0398
BF	0,0290	<i>0,0333</i>	<i>0,0248</i>	0,1136		0,0773	0,0280	0,0906	0,0497	0,0433	<i>0,0005</i>	0,0181
BE	<i>0,0137</i>	<i>0,0198</i>	<i>0,0083</i>	0,0699	0,0411		0,0832	0,0157	0,0252	0,0260	0,0783	0,0638
CF	0,1407	<i>0,0444</i>	0,0866	<i>0,1352</i>	0,0749	0,1105		0,0844	0,0711	0,0500	0,0168	0,0125
B	0,0429	0,0549	0,0344	0,0840	0,0536	<i>-0,0028</i>	0,1122		0,0516	0,0408	0,0817	0,0692
A	<i>0,0378</i>	0,0339	<i>0,0151</i>	<i>0,0065</i>	0,0872	<i>0,0235</i>	0,1337	0,0466		0,0107	0,0514	0,0492
D	0,0764	<i>0,0583</i>	0,0497	0,0762	0,0743	<i>0,0235</i>	<i>0,1027</i>	<i>0,0047</i>	0,0508		0,0382	0,0305
LI	0,0392	<i>0,0161</i>	<i>0,0377</i>	0,1011	<i>0,0132</i>	0,0639	0,0828	0,0793	0,0784	0,0824		0,0143
BR	0,0629	<i>0,0421</i>	<i>0,0260</i>	0,0769	0,0338	<i>0,0132</i>	0,0540	<i>0,0043</i>	0,0541	<i>-0,0007</i>	0,0552	
CV	<i>0,0274</i>	<i>0,0082</i>	<i>0,0136</i>	<i>0,0292</i>	0,0797	0,0495	<i>0,1131</i>	0,0815	<i>0,0199</i>	0,0643	0,0577	0,0757
MA	0,0562	0,0331	0,0359	0,0610	0,0849	<i>0,0104</i>	0,0937	<i>0,0061</i>	0,0261	<i>0,0081</i>	0,0870	<i>0,0144</i>
FI	0,1051	<i>0,0309</i>	0,0674	0,0890	0,0707	0,0738	<i>0,0309</i>	0,0784	0,0737	0,0501	0,0362	<i>0,0369</i>
MT	0,0556	<i>0,0462</i>	<i>0,0168</i>	0,0609	<i>0,0218</i>	<i>0,0287</i>	<i>0,0409</i>	<i>0,0291</i>	0,0584	<i>0,0307</i>	<i>0,0332</i>	<i>0,0005</i>
SA	0,0888	0,1205	0,0572	0,0461	0,0907	0,0812	0,1432	0,0733	0,0790	0,0881	0,0826	0,0737
MG	0,3457	0,2699	0,2891	0,2449	0,2805	0,3314	0,1605	0,3057	0,3051	0,2502	0,2546	0,2531
BS	0,1911	0,1181	0,1582	0,1581	0,1763	0,1637	0,0512	0,1571	0,1697	0,1457	0,1628	0,1391
CO	0,1499	0,0922	0,1114	0,1384	0,1166	0,1216	<i>0,0107</i>	0,1219	0,1426	0,1173	0,1422	0,0953
BA	0,1307	0,0583	0,1104	0,1547	0,1042	0,1117	<i>0,0052</i>	0,1159	0,1421	0,1097	0,1135	0,0940
MD	0,1263	0,1169	0,0779	0,0959	0,0584	0,1056	0,0588	0,0952	0,1218	0,0888	0,0733	0,0542
VC	0,1326	0,1000	0,0899	0,1174	0,0474	0,1119	0,0761	0,1025	0,1172	0,0925	0,0446	0,0524

	CV	MA	FI	MT	SA	MG	BS	CO	BA	MD	VC
CM	0,0130	0,0421	0,0842	0,0408	0,0692	0,2260	0,1921	0,1836	0,1684	0,2062	0,2268
L	0,0116	0,0480	0,0956	0,0381	0,0590	0,2161	0,1790	0,1746	0,1573	0,1816	0,2076
ES	0,0262	0,0255	0,0555	0,0358	0,0752	0,1960	0,5198	0,1481	0,1262	0,0173	0,2052
VT	0,3042	0,0521	0,0526	0,0142	0,0513	0,1846	0,1524	0,1460	0,1245	0,1713	0,1915
BF	0,0488	0,0669	0,0372	0,0167	0,0450	0,1772	0,1337	0,1207	0,1020	0,1578	0,1814
BE	0,0281	0,0207	0,0961	0,0591	0,0969	0,0233	0,1988	0,2000	0,1761	0,2166	0,2400
CF	0,06395	0,0585	0,0300	0,0402	0,0831	0,1876	0,1438	0,1401	0,1239	0,1918	0,2312
B	0,0442	<i>0,00584</i>	0,0860	0,0595	0,0843	0,2004	0,1775	0,1753	0,1594	0,2005	0,2225
A	0,0073	0,0464	0,0744	0,0516	0,0795	0,2364	0,1942	0,1902	0,1723	0,2165	0,2350
D	0,0070	0,0316	0,0609	0,0302	0,0455	0,2029	0,1541	0,1436	0,1399	0,1749	0,2058
LI	0,0470	0,0570	0,0299	<i>0,0084</i>	0,0423	0,1669	0,1239	0,1163	0,1023	0,0149	0,1809
BR	0,0476	0,0467	0,0110	0,0343	0,0778	0,1919	0,1480	0,1383	0,1236	0,1942	0,2246
CV		0,0383	0,0665	0,0282	0,0536	0,2022	0,1674	0,1599	0,1463	0,1759	0,2015
MA	0,0558		0,0719	0,0405	0,0664	0,1894	0,1526	0,1480	0,1324	0,1842	0,2056
FI	0,0749	0,0658		0,0521	0,0892	0,1808	0,1526	0,1468	0,1310	0,2050	0,2363
MT	0,0631	0,0471	<i>0,0230</i>		<i>0,0126</i>	0,1524	0,1102	0,1080	0,0856	0,1152	0,1438
SA	0,0916	0,0978	0,0887	<i>0,0246</i>		0,1131	0,0749	0,0695	0,0660	0,0867	0,1191
MG	0,2570	0,2889	0,1706	0,2069	0,2444		0,0607	0,0719	0,0655	0,1042	0,1449
BS	0,1403	0,1382	0,0823	0,1083	0,1460	0,1079		0,0130	0,0192	0,0499	0,0989
CO	0,1173	0,1154	0,0838	0,0765	0,1403	0,1214	0,0185		0,0093	0,0542	0,1076
BA	0,1028	0,1062	0,0646	0,0801	0,1516	0,1309	<i>0,0113</i>	<i>-0,0023</i>		0,0526	0,0974
MD	0,1244	0,1220	0,0507	<i>0,0105</i>	<i>0,0367</i>	0,1339	0,1065	0,0755	0,0939		0,0182
VC	0,1469	0,1197	0,0357	0,0333	0,0956	0,2093	0,1721	0,1353	0,1354	<i>0,0244</i>	

Tab.7: Differenziamento genetico in Cerro. F_{ST} (matrice superiore) e R_{ST} (matrice inferiore) tra coppie di popolazioni. Valori non significativi ($P > 0.05$) sono indicati in corsivo.

Isolamento da Distanza

Al fine di evidenziare un eventuale fenomeno di isolamento da distanza un test di Mantel è stato effettuato per saggiare l'ipotesi di correlazione tra la matrice delle distanze genetiche (utilizzando $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ come stima) e quella delle distanze geografiche (lineari) tra popolazioni. Il coefficiente di correlazione non è risultato significativo al livello di probabilità del 95% ($P = 0,88$, $G = -1,136$, $Z = 0,81$), e pertanto si può ragionevolmente supporre che il differenziamento delle popolazioni non sia principalmente il risultato di un equilibrio tra processi di migrazione e di deriva genetica.

Struttura delle Popolazioni

Considerando che questo studio è focalizzato su una specie di quercia che non è mai stata studiata da questo punto di vista appare di fondamentale importanza stimare il valore di K , il numero più probabile di "unità genetiche" o "pool genetici" presenti nelle popolazioni, al fine di suggerire i possibili meccanismi che possono aver dato forma all'attuale variabilità genetica rendendo possibile successivamente l'elaborazione di strategie di conservazione della biodiversità (ad esempio pianificando le popolazioni da cui raccogliere seme o gli interventi selvicolturali). Tramite l'utilizzo del programma Structure 2.3.3 è stata quindi effettuata un'analisi bayesiana che ha evidenziato come valore più probabile $K = 2$, suggerendo quindi che l'attuale assetto genetico sia derivato da due pool genetici originari. I risultati delle simulazioni con $K = 2$ sono mostrati nella Fig.1: come si può notare l'analisi della composizione genetica mostra che le popolazioni CM, L, ES, VT, BF, BE, CF, B, A, D, LI, BR, CV, MA, FI e MT esibiscono una preponderanza del primo pool genetico che è stato inferito a differenza delle popolazioni MG, BS, CO, BA, MD e VC in cui invece prevale il secondo. Un'eccezione in tal senso è rappresentata dalla popolazione SA in cui circa il 55% ed il 45% del primo e del secondo pool genetico sono presenti.

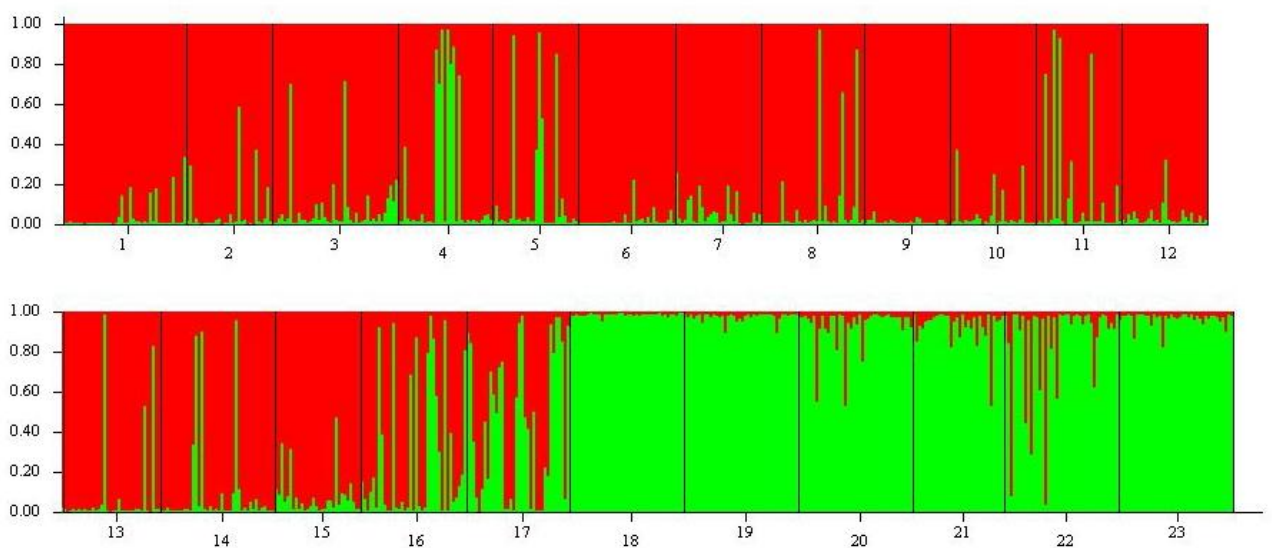


Fig.1: Analisi bayesiana, con $K = 2$, per tutte le popolazioni. Ciascun albero è indicato da una barra verticale in cui le colorazioni rossa e verde indicano la frazione di ciascuno dei pool genetici originari.

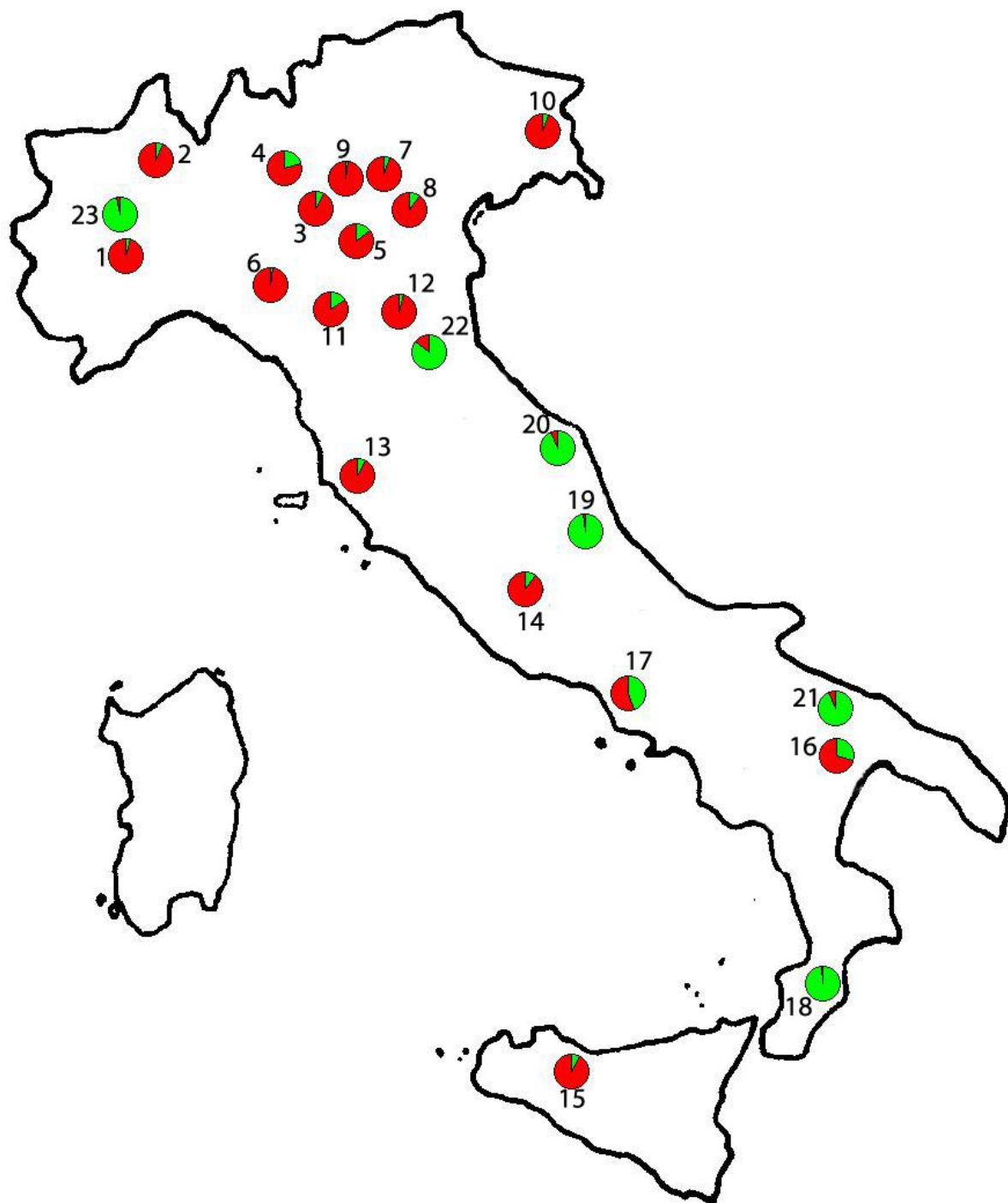


Fig.2: Struttura genetica delle popolazioni di Cerro, rappresentazione geografica dei risultati.

AMOVA

Tramite una procedura di analisi della varianza molecolare (AMOVA) la variazione genetica totale è stata partizionata in accordo con i risultati dell'analisi bayesiana. È stata verificata l'ipotesi per $K = 2$ che distingue le popolazioni in due gruppi: il primo comprende le popolazioni CM, L, ES, VT, BF, BE, CF, B, A, D, LI, BR, CV, MA, FI e M con preponderanza del primo dei due gruppi genetici ancestrali ed il secondo, in cui prevale il secondo pool genico originario, le popolazioni: MG, BS, CO, BA, MD e VC. La popolazione SA è stata esclusa dall'analisi in quanto ha una proporzione dei due pool genici originari del 55-45% e pertanto non è inquadrabile nelle due categorie precedentemente descritte. La scomposizione del parametro F_{ST} nelle sue componenti ha evidenziato che la variabilità genetica all'interno delle popolazioni è responsabile del 76% della differenziazione totale mentre quella tra le due regioni, suggerite dall'analisi bayesiana, incide solo per il 16%.

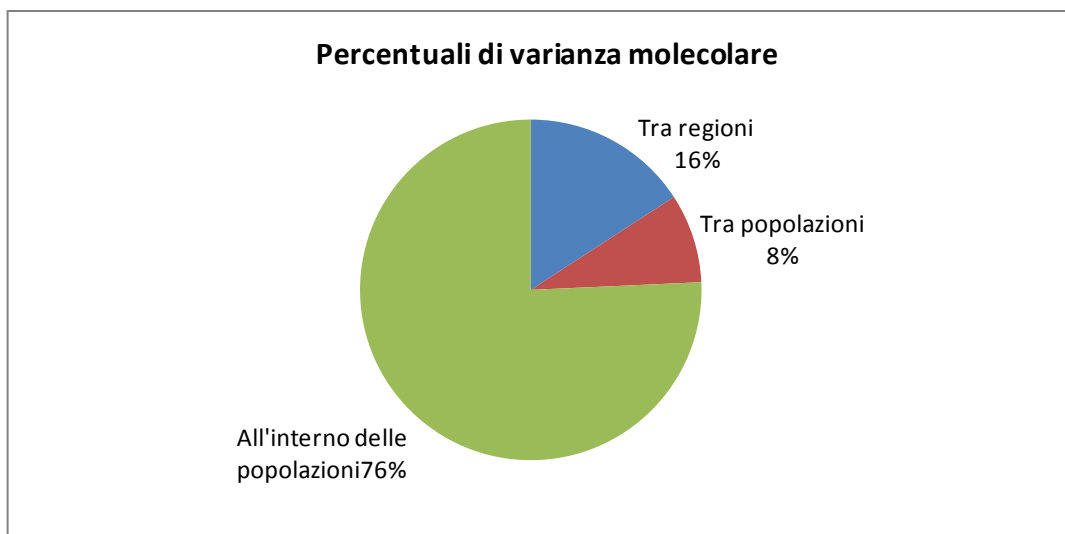


Fig.3: AMOVA: test dell'ipotesi secondo la quale le 22 popolazioni considerate sono divise in due regioni sulla base della loro appartenenza ad uno dei due pool genici evidenziati dall'analisi bayesiana.

Complesso *Ulmus minor/Ulmus pumila*

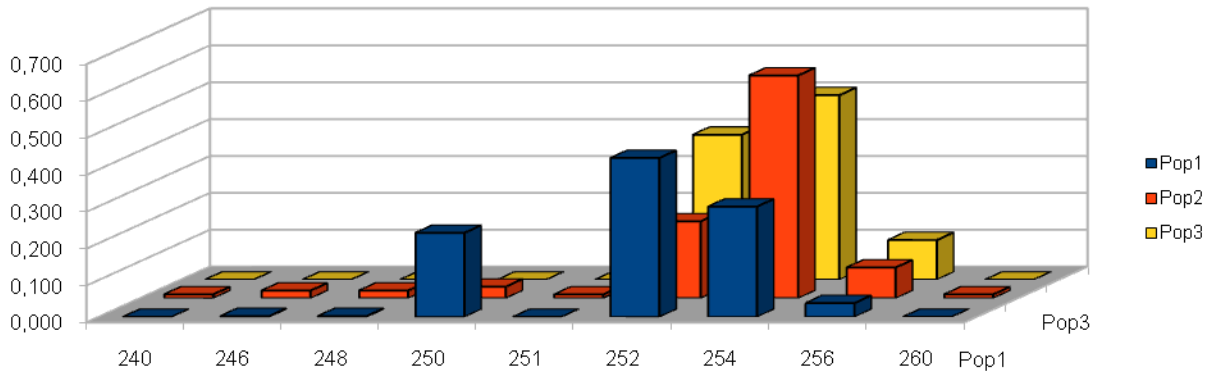
Variabilità genetica

La ricerca è stata incentrata sulla genotipizzazione di 531 individui di olmo, campionati nelle popolazioni di Porporana (FE) e Muzzana del Turgnano (UD), tramite l'utilizzo di sei loci microsatelliti nucleari.

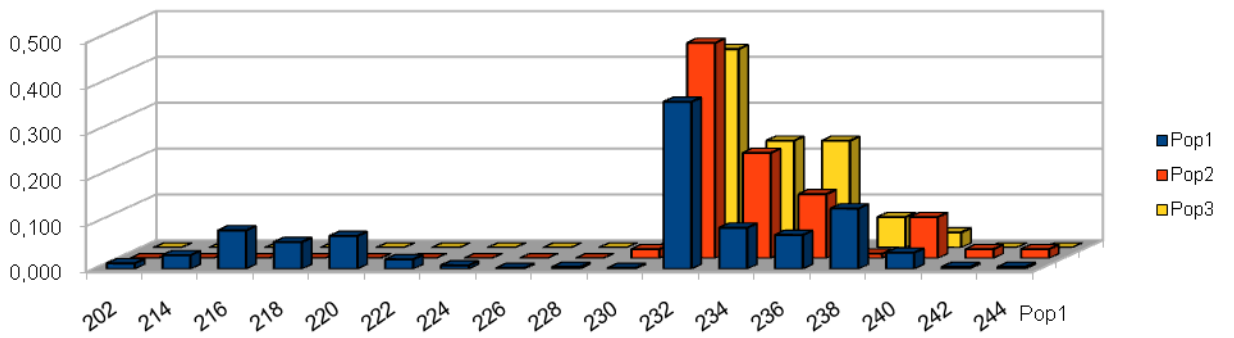
I parametri genetici sono stati calcolati raggruppando i dati con tre diverse modalità. Il primo conteggio è stato effettuato considerando due gruppi, basati sulle provenienze geografiche dei campioni, e denominati "Porporana" e "Muzzana". Il secondo conteggio ha suddiviso i campioni nei gruppi *Ulmus minor*: "*minor*", *Ulmus pumila*: "*pumila*" e putativi ibridi: "ibridi" ed è basato su una distinzione botanica a prescindere dalla provenienza. La terza computazione è stata effettuata suddividendo i campioni in cinque gruppi che tengono conto sia della provenienza geografica che di altre caratteristiche delle popolazioni: *Ulmus minor* di Porporana dal nucleo interno: "PomiInt", *Ulmus minor* di Porporana dal nucleo esterno: "PomiEst", *Ulmus pumila* di Porporana: "Popu", *Ulmus minor* di Muzzana: "Mumi" e *Ulmus pumila* di Muzzana: "Mupu".

La distribuzione di frequenza dei differenti alleli è molto simile in entrambe le specie e nel gruppo degli ibridi, come si può evincere dalle figure sotto riportate e, sebbene esistano alcuni alleli esclusivi, la loro scarsità numerica e/o ridotta frequenza non permette di utilizzare la presenza o assenza di un determinato allele come criterio di appartenenza ad un determinato gruppo.

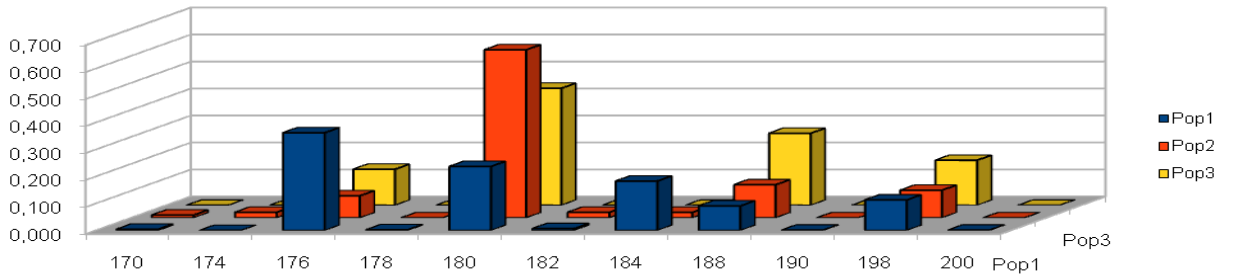
UR123



UR138



UR158



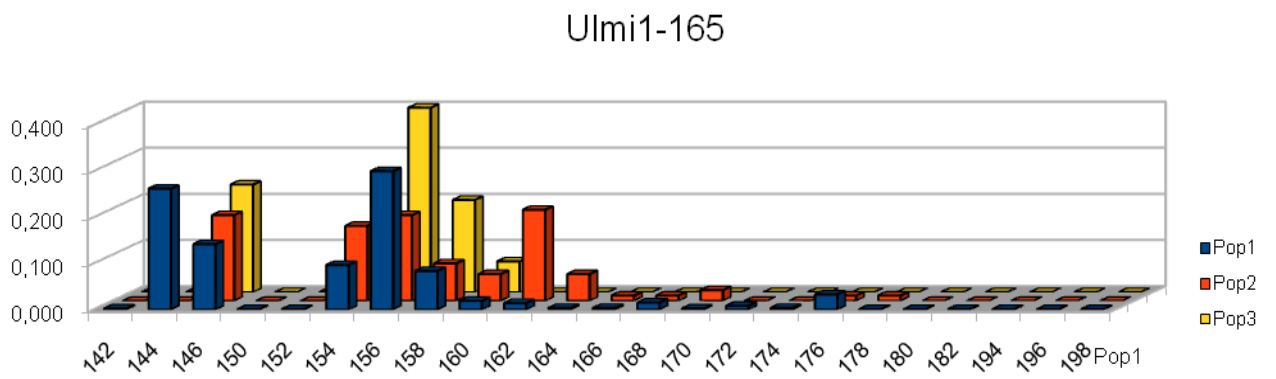
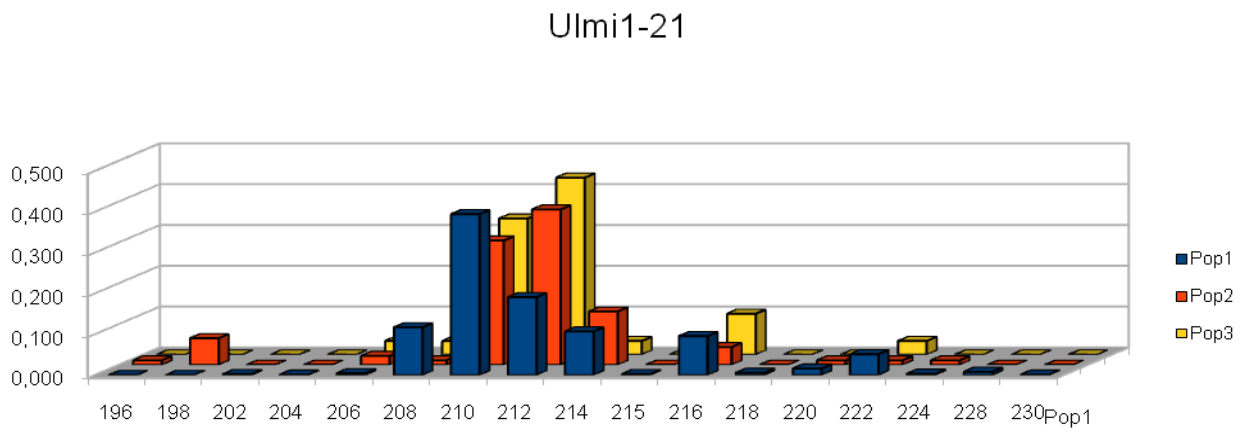
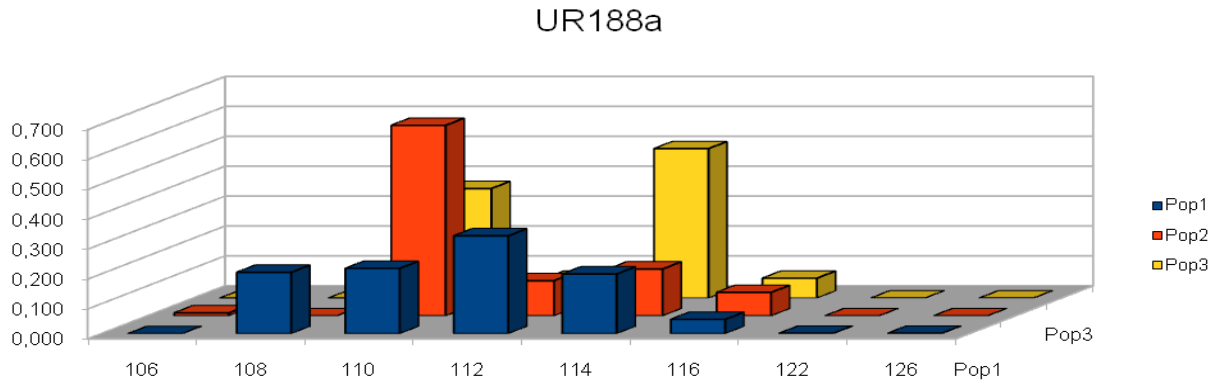


Fig. 1: Frequenze alleliche per i sei loci studiati. Pop1 = *minor*, Pop2 = *pumila*, Pop3 = ibridi.

Le misure della diversità genetica, per ciascuna delle tre procedure di calcolo, sono riportate nelle tabelle 1, 2, 3. Il numero di alleli per locus varia da 3 (locus UR123 negli ibridi) a 23 (locus Ulmi1-165 in *U. minor*) anche se il numero effettivo di alleli è generalmente di molto inferiore indicando che, nonostante siano spesso presenti numerosi alleli, i più frequenti sono costituiti da una frazione ridotta dei totali. L'eterozigosità attesa di Nei (H_e) è pari, in media, a 0.744 per i gruppi Porporana/Muzzana, 0.667 per i gruppi *minor/pumila*/ibridi e 0.693 per la suddivisione PomiInt/PomiEst/Popu/Mumi/Mupu. I valori di eterozigosità hanno un errore standard ridotto indicando che il range di variabilità è piuttosto ristretto ed i valori delle medie dei singoli sottogruppi non si discostano di molto dal valore medio del gruppo di appartenenza. Per i loci considerati quindi H_e raggiunge livelli medio alti in relazione alla biologia riproduttiva delle specie (impollinazione e disseminazione entomofila) ed alle peculiarità ecologiche delle popolazioni studiate (nuclei di ridotta estensione e frammentati).

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
Porporana	UR123	5,000	3,012	0,460	0,668
	UR138	16,000	4,972	0,572	0,799
	UR158	7,000	4,018	0,707	0,751
	UR188A	8,000	4,110	0,748	0,757
	Ulmi1-21	15,000	4,450	0,647	0,775
	Ulmi1-165	17,000	4,896	0,392	0,796
	Media	11,333	4,243	0,588	0,758
	Errore st.	2,140	0,294	0,057	0,020
Muzzana	UR123	9,000	2,449	0,477	0,592
	UR138	15,000	5,031	0,582	0,801
	UR158	10,000	3,952	0,329	0,747
	UR188a	4,000	3,244	0,522	0,692
	Ulmi1-21	10,000	3,331	0,655	0,700
	Ulmi1-165	20,000	6,944	0,520	0,856
	Media	11,333	4,158	0,514	0,731
	Errore st.	2,246	0,659	0,045	0,038
Tutte le pop.	Media	11,333	4,201	0,551	0,744
	Errore st.	1,479	0,344	0,036	0,021

Tab.1: Variabilità genetica in *Ulmus*. N_a = numero di alleli, N_e = numero effettivo di alleli, H_o = eterozigosità osservata, H_E = eterozigosità attesa nei gruppi Porporana, Muzzana.

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
<i>U. minor</i>	UR123	6,000	3,044	0,465	0,671
	UR138	17,000	5,475	0,596	0,817
	UR158	10,000	4,145	0,684	0,759
	UR188a	7,000	4,187	0,752	0,761
	Ulmi1-21	15,000	4,364	0,639	0,771
	Ulmi1-165	23,000	5,061	0,411	0,802
	Media	13,000	4,379	0,591	0,764
Errore st.	2,671	0,344	0,053	0,021	
<i>U. pumila</i>	UR123	9,000	2,395	0,375	0,582
	UR138	8,000	3,303	0,340	0,697
	UR158	8,000	2,376	0,347	0,579
	UR188a	5,000	2,218	0,431	0,549
	Ulmi1-21	11,000	3,823	0,652	0,738
	Ulmi1-165	12,000	6,699	0,488	0,851
	Media	8,833	3,469	0,439	0,666
Errore st.	1,014	0,695	0,048	0,048	
ibridi	UR123	3,000	2,405	0,714	0,584
	UR138	5,000	3,309	0,667	0,698
	UR158	4,000	3,285	0,533	0,696
	UR188a	4,000	2,542	0,333	0,607
	Ulmi1-21	7,000	3,191	0,933	0,687
	Ulmi1-165	5,000	3,719	0,200	0,731
	Media	4,667	3,075	0,563	0,667
Errore st.	0,558	0,205	0,109	0,024	
Tutte le pop.	Media	8,833	3,641	0,531	0,699
	Errore st.	1,229	0,284	0,044	0,021

Tab.2: Variabilità genetica in *Ulmus*. N_a = numero di alleli, N_e = numero effettivo di alleli, H_o = eterozigosità osservata, H_E = eterozigosità attesa nei gruppi *minor*, *pumila*, ibridi.

Popolazione	Locus	Na	Ne	Ho	He
Pomi int.	UR123	5,000	2,836	0,429	0,647
	UR138	14,000	5,287	0,596	0,811
	UR158	7,000	3,643	0,775	0,726
	UR188A	6,000	3,639	0,796	0,725
	Ulmi1-1	15,000	4,006	0,621	0,750
	Ulmi1-165	14,000	4,322	0,402	0,769
	Media	10,167	3,956	0,603	0,738
	Errore st.	1,887	0,335	0,068	0,022
	Pomi est.	UR123	4,000	2,339	0,593
UR138		9,000	3,218	0,491	0,689
UR158		5,000	3,668	0,407	0,727
UR188A		5,000	2,421	0,623	0,587
Ulmi1-1		10,000	3,618	0,685	0,724
Ulmi1-165		9,000	4,250	0,341	0,765
Media		7,000	3,252	0,523	0,677
Errore st.		1,065	0,307	0,054	0,032
PoPu		UR123	3,000	2,057	0,450
	UR138	5,000	3,034	0,364	0,670
	UR158	5,000	2,495	0,455	0,599
	UR188A	5,000	2,091	0,500	0,522
	Ulmi1-1	8,000	3,723	0,773	0,731
	Ulmi1-165	7,000	4,765	0,444	0,790
	Media	5,500	3,027	0,498	0,638
	Errore st.	0,719	0,432	0,058	0,046
	Mumi	UR123	6,000	2,341	0,544
UR138		14,000	5,910	0,695	0,831
UR158		9,000	5,186	0,353	0,807
UR188A		4,000	3,583	0,610	0,721
Ulmi1-1		8,000	3,292	0,695	0,696
Ulmi1-165		19,000	6,288	0,543	0,841
Media		10,000	4,433	0,573	0,745
Errore st.		2,266	0,648	0,052	0,042
Mupu		UR123	9,000	2,618	0,321
	UR138	8,000	3,439	0,321	0,709
	UR158	8,000	2,253	0,259	0,556
	UR188A	4,000	2,279	0,379	0,561
	Ulmi1-1	6,000	3,523	0,542	0,716
	Ulmi1-165	12,000	6,720	0,520	0,851
	Media	7,833	3,472	0,391	0,669
	Errore st.	1,108	0,688	0,047	0,046
	Tutte le pop.	Media	8,100	3,628	0,518
Errore st.		0,713	0,231	0,027	0,018

Tab.3: Variabilità genetica in *Ulmus*. Na= numero di alleli, Ne= numero effettivo di alleli,

H₀= eterozigotà osservata, H_E = eterozigotà attesa nei gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato saggiato per tutti i loci ed in tutti i gruppi precedentemente descritti. In termini generali si osserva un diffuso scostamento dalle condizioni di equilibrio con elevati valori di significatività. Inaspettatamente il gruppo dei putativi ibridi mostra che tre loci su sei si trovano in condizioni di equilibrio e questo risultato è confermato dalla procedura di calcolo, statisticamente più raffinata, che considera la deviazione del parametro F_{IS} da zero sotto ipotesi nulla. Nella suddivisione a cinque gruppi Popu presenta solo la metà dei loci non in equilibrio e tale quota si riduce ad un terzo nel gruppo Mumi. I gruppi PomiInt e Mupu sono completamente fuori dall'equilibrio mentre il gruppo PomiEst solo il locus UR123 è in condizioni di equilibrio.

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif (Chi quadro)	Signif (Fisher)
Porporana	UR123	10	172,971	0,000	***	***
	UR138	120	1538,579	0,000	***	***
	UR158	21	1136,463	0,000	***	***
	UR188a	28	533,481	0,000	***	***
	Ulmi1-21	105	692,466	0,000	***	***
	Ulmi1-165	136	1459,096	0,000	***	***
Muzzana	UR123	36	107,088	0,000	***	***
	UR138	105	356,027	0,000	***	***
	UR158	45	369,928	0,000	***	***
	UR188a	6	111,148	0,000	***	***
	Ulmi1-21	45	140,935	0,000	***	***
	Ulmi1-165	190	570,555	0,000	***	***

Tab.4: test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg nei gruppi Porporana, Muzzana.

ns= non significativo, *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$.

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif (Chi quadro)	Signif (Fisher)
<i>U. minor</i>	UR123	15	390,383	0,000	***	***
	UR138	136	1537,352	0,000	***	***
	UR158	45	1532,111	0,000	***	***
	UR188a	21	544,249	0,000	***	***
	Ulmi1-21	105	706,640	0,000	***	***
	Ulmi1-165	253	2449,858	0,000	***	***
<i>U. pumila</i>	UR123	36	88,258	0,000	***	***
	UR138	28	108,840	0,000	***	***
	UR158	28	173,023	0,000	***	***
	UR188a	10	45,885	0,000	***	***
	Ulmi1-21	55	75,070	0,037	*	***
	Ulmi1-165	66	124,472	0,000	***	***
ibridi	UR123	3	9,222	0,026	*	***
	UR138	10	2,983	0,982	ns	ns
	UR158	6	6,634	0,356	ns	ns
	UR188a	6	34,170	0,000	***	***
	Ulmi1-21	21	11,355	0,955	ns	ns
	Ulmi1-165	10	36,735	0,000	***	***

Tab.5: test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg nei gruppi *minor*, *pumila*, ibridi.

ns= non significativo, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001.

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif (Chi quadro)	Signif (Fisher)
Pomi int.	UR123	10	128,283	0,000	***	***
	UR138	91	1028,478	0,000	***	***
	UR158	21	902,062	0,000	***	***
	UR188a	15	380,354	0,000	***	***
	Ulmi1-21	105	644,432	0,000	***	***
	Ulmi1-165	91	719,105	0,000	***	***
Pomi est.	UR123	6	3,093	0,797	ns	ns
	UR138	36	134,574	0,000	***	***
	UR158	10	52,106	0,000	***	***
	UR188a	10	86,595	0,000	***	***
	Ulmi1-21	45	90,452	0,000	***	***
	Ulmi1-165	36	126,022	0,000	***	***
PoPu	UR123	3	8,370	0,039	*	ns
	UR138	10	18,697	0,044	*	***
	UR158	10	14,690	0,144	ns	ns
	UR188a	10	29,619	0,001	***	***
	Ulmi1-1	28	22,465	0,759	ns	ns
	Ulmi1-165	21	38,541	0,011	*	***
Mumi	UR123	15	59,230	0,000	***	ns
	UR138	91	199,596	0,000	***	***
	UR158	36	196,842	0,000	***	***
	UR188a	6	77,411	0,000	***	***
	Ulmi1-21	28	52,382	0,003	**	ns
	Ulmi1-165	171	388,435	0,000	***	***
Mupu	UR123	36	65,647	0,002	**	***
	UR138	28	85,643	0,000	***	***
	UR158	28	129,088	0,000	***	***
	UR188a	6	26,712	0,000	***	***
	Ulmi1-21	15	27,227	0,027	*	***
	Ulmi1-165	66	99,697	0,005	**	***

Tab.6: test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg nei gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu.

ns= non significativo, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001.

Linkage disequilibrium

La deviazione dalla casualità nell'associazione tra alleli a diversi loci (linkage disequilibrium) è stata testata, ad un livello di significatività del 95%, per tutti le coppie di loci ed in tutti i gruppi. I risultati sono riportati nelle tabelle 7, 8, 9. La popolazione di Porporana si trova in condizioni di linkage disequilibrium per tutte le coppie alleliche considerate tranne una. Anche il gruppo *minor* appare essere in una situazione analoga. La stima di questo parametro, effettuata sulla suddivisione a cinque gruppi, mette comunque in evidenza che il linkage disequilibrium nella popolazione di Porporana è attribuibile esclusivamente al nucleo interno PomiInt mentre il nucleo esterno PomiEst appare in condizioni di equilibrio.

Coppia di loci	Porporana	Muzzana	Pop. raggruppate
UR123-UR138	0.00%	72.00%	0.00%
UR123-UR158	0.00%	72.00%	26.00%
UR123-UR188A	0.00%	20.00%	0.00%
UR123-Ulmi1-21	2.00%	4.00%	4.00%
UR123-Ulmi1-165	4.00%	52.00%	14.00%
UR138-UR158	0.00%	82.00%	0.00%
UR138-UR188a	2.00%	2.00%	0.00%
UR138-Ulmi1-21	0.00%	100.00%	0.00%
UR138-Ulmi1-165	0.00%	32.00%	4.00%
UR158-UR188a	0.00%	28.00%	0.00%
UR158-Ulmi1-21	2.00%	0.00%	0.00%
UR158-Ulmi1-165	0.00%	34.00%	10.00%
UR188A-Ulmi1-21	0.00%	12.00%	0.00%
UR188A-Ulmi1-165	0.00%	0.00%	2.00%
Ulmi1-21-Ulmi1-165	6.00%	76.00%	10.00%

Tab.7: test per il linkage disequilibrium nei gruppi Porporana, Muzzana.

In rosso le coppie alleliche non all'equilibrio con significatività al 5%.

Coppia di loci	<i>U. minor</i>	<i>U. pumila</i>	ibridi	Pop. Raggruppate
UR123-UR138	0.00%	42.00%	2.00%	0.00%
UR123-UR158	0.00%	94.00%	58.00%	4.00%
UR123-UR188A	0.00%	68.00%	62.00%	0.00%
UR123-Ulmi1-21	0.00%	10.00%	18.00%	6.00%
UR123-Ulmi1-165	0.00%	32.00%	46.00%	0.00%
UR138-UR158	0.00%	84.00%	56.00%	0.00%
UR138-UR188a	2.00%	30.00%	34.00%	0.00%
UR138-Ulmi1-21	2.00%	22.00%	26.00%	2.00%
UR138-Ulmi1-165	2.00%	42.00%	76.00%	0.00%
UR158-UR188a	0.00%	38.00%	70.00%	4.00%
UR158-Ulmi1-21	0.00%	4.00%	4.00%	0.00%
UR158-Ulmi1-165	4.00%	10.00%	22.00%	4.00%
UR188A-Ulmi1-21	6.00%	52.00%	90.00%	6.00%
UR188A-Ulmi1-165	2.00%	30.00%	76.00%	4.00%
Ulmi1-21-Ulmi1-165	0.00%	74.00%	82.00%	0.00%

Tab.8: test per il linkage disequilibrium nei gruppi *minor*, *pumila*, ibridi.

In rosso le coppie alleliche non all'equilibrio con significatività al 5%.

Coppia di loci	Pomi int.	Pomi est.	PoPu	Mumi	Mupu	Pop. Raggr.
UR123-UR138	0.00%	20.00%	14.00%	38.00%	72.00%	0.00%
UR123-UR158	0.00%	56.00%	68.00%	16.00%	82.00%	34.00%
UR123-UR188A	0.00%	48.00%	18.00%	34.00%	78.00%	0.00%
UR123-Ulmi1-21	2.00%	64.00%	80.00%	12.00%	6.00%	0.00%
UR123-Ulmi1-165	0.00%	68.00%	38.00%	72.00%	52.00%	0.00%
UR138-UR158	0.00%	64.00%	48.00%	78.00%	82.00%	6.00%
UR138-UR188a	0.00%	74.00%	14.00%	2.00%	4.00%	0.00%
UR138-Ulmi1-21	0.00%	60.00%	12.00%	74.00%	70.00%	0.00%
UR138-Ulmi1-165	2.00%	80.00%	30.00%	44.00%	66.00%	2.00%
UR158-UR188a	2.00%	52.00%	56.00%	20.00%	4.00%	2.00%
UR158-Ulmi1-21	2.00%	14.00%	22.00%	10.00%	12.00%	0.00%
UR158-Ulmi1-165	0.00%	18.00%	42.00%	92.00%	20.00%	18.00%
UR188A-Ulmi1-21	2.00%	0.00%	20.00%	2.00%	44.00%	2.00%
UR188A-Ulmi1-165	0.00%	16.00%	38.00%	0.00%	2.00%	0.00%
Ulmi1-21-Ulmi1-165	8.00%	34.00%	4.00%	84.00%	70.00%	0.00%

Tab.9: test per il linkage disequilibrium nei gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu..

In rosso le coppie alleliche non all'equilibrio con significatività al 5%.

Statistiche di Fisher

Le statistiche di Fisher (Tab. 10, 11, 12) mostrano una tendenza ad un moderato tasso di inbreeding in tutte e tre le suddivisioni con le quali sono stati elaborati i dati. Il valore di F_{IS} infatti è circa 0,244, in media, per tutte le suddivisioni. Il valore di F_{ST} , seppur significativamente diverso da zero, è invece inferiore di circa un ordine di grandezza indicando che i gruppi presentano un livello contenuto di differenziazione ed il valore della quota di inbreeding totale F_{IT} è, in massima parte, attribuibile al tasso di inbreeding presente all'interno delle sottopopolazioni.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
UR123	0,256	0,302	0,062
UR138	0,279	0,295	0,023
UR158	0,308	0,333	0,036
UR188A	0,123	0,162	0,044
Ulmi1-21	0,117	0,138	0,024
Ulmi1-165	0,448	0,464	0,028
Media	0,255	0,282	0,036
Errore st.	0,051	0,049	0,006

Tab.10: Differenziamento genetico in *Ulmus*. Statistiche di Fisher nelle popolazioni di Porporana e Muzzana.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
UR123	0,154	0,202	0,057
UR138	0,275	0,293	0,024
UR158	0,231	0,287	0,073
UR188a	0,209	0,293	0,106
Ulmi1-21	-0,013	0,012	0,024
Ulmi1-165	0,539	0,560	0,046
Media	0,233	0,274	0,055
Errore st.	0,074	0,072	0,013

Tab.11: Differenziamento genetico in *Ulmus*. Statistiche di Fisher nei gruppi *minor*, *pumila*, ibridi.

Locus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
UR123	0,201	0,261	0,075
UR138	0,335	0,360	0,038
UR158	0,341	0,388	0,071
UR188A	0,067	0,181	0,123
Ulmi1-1	0,084	0,124	0,045
Ulmi1-165	0,439	0,474	0,061
Media	0,244	0,298	0,069
Errore st.	0,062	0,054	0,012

Tab.12: Differenziamento genetico in *Ulmus*. Statistiche di Fisher nei gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu.

La differenziazione dei vari gruppi in cui sono stati suddivisi i campioni è stata misurata tramite la determinazione dei valori dei parametri genetici F_{ST} e R_{ST} per ciascuna coppia di popolazioni (Tab. 13, 14, 15). Il parametro R_{ST} è concettualmente simile alla classica misura di differenziamento, ottenuta tramite F_{ST} , ma considera anche la differenza nelle dimensioni degli alleli ed indica, qualora assuma valori significativi, una differenziazione occorsa da un numero elevato di generazioni. La significatività dei valori determinati è stata verificata tramite un test delle permutazioni (1000 permutazioni dei dati). Il differenziamento tra la popolazione di Porporana e di Muzzana è piuttosto basso ma statisticamente significativo ed inoltre il valore di R_{ST} è superiore a quello di F_{ST} . I gruppi *minor* e *pumila* risultano leggermente più differenziati ma il gruppo *pumila*, a differenza del gruppo *minor*, non appare essere marcatamente distinto dal gruppo dei putativi ibridi (valore di R_{ST} non significativo e valore F_{ST} abbastanza ridotto). Nella suddivisione a sei gruppi la popolazione più differenziata è rappresentata da PomiInt con valori di R_{ST} e F_{ST} piuttosto elevati e paragonabili a quelli che si osservano nei confronti con i gruppi che comprendono campioni della specie *pumila*. La distinzione del gruppo dei putativi ibridi appare scarsamente significativa a parte con i gruppi PomiInt e Mupu. E' da notare che in parecchi casi il valore di R_{ST} è superiore al corrispondente valore di F_{ST} .

	Porporana	Muzzana
Porporana		0,06346
Muzzana	0,0895	

Tab.13: Differenziamento genetico in *Ulmus*. F_{ST} (valore superiore) e R_{ST} (valore inferiore) tra coppie di popolazioni. Entrambi i valori sono significativi ($P < 0.05$).

	<i>U. minor</i>	<i>U. pumila</i>	ibridi
<i>U. minor</i>		0,09045	0,05543
<i>U. pumila</i>	0,0588		0,02607
ibridi	0,0851	<i>0,0403</i>	

Tab.14: Differenziamento genetico in *Ulmus*. F_{ST} (matrice superiore) e R_{ST} (matrice inferiore) tra coppie di popolazioni. I valori non significativi ($P > 0.05$) sono indicati in corsivo.

	Pomi int.	Pomi est.	PoPu	Mumi	Mupu	ibridi
Pomi int.		0,1135	0,1362	0,0857	0,1301	0,0987
Pomi est.	0,1408		0,0240	0,0341	0,0518	<i>-0,1342</i>
PoPu	0,1134	0,0364		0,0326	<i>0,0020</i>	<i>0,0176</i>
Mumi	0,1471	0,0218	0,0461		0,0297	<i>0,0111</i>
Mupu	0,1061	0,0980	0,0506	0,0491		0,0342
ibridi	0,1438	<i>-0,0026</i>	<i>0,0255</i>	<i>0,0375</i>	0,0734	

Tab.15: Differenziamento genetico in *Ulmus*. F_{ST} (matrice superiore) e R_{ST} (matrice inferiore) tra coppie di popolazioni. I valori non significativi ($P > 0.05$) sono indicati in corsivo.

AMOVA

L'ipotesi di una netta distinzione del gruppo PomiInt rispetto agli altri è stata saggiata tramite una procedura di analisi della varianza molecolare (AMOVA). Il parametro F_{ST} è stato quindi scomposto nelle sue componenti ed è stato evidenziato che, nonostante i valori significativamente elevati di F_{ST} e di R_{ST} del gruppo PomiInt, la maggior parte della variabilità è imputabile a quella riscontrabile all'interno delle popolazioni (85%). Le due regioni (costituite dal gruppo PomiInt e dagli altri raggruppamenti) rendono conto di solo il 12% della varianza totale.

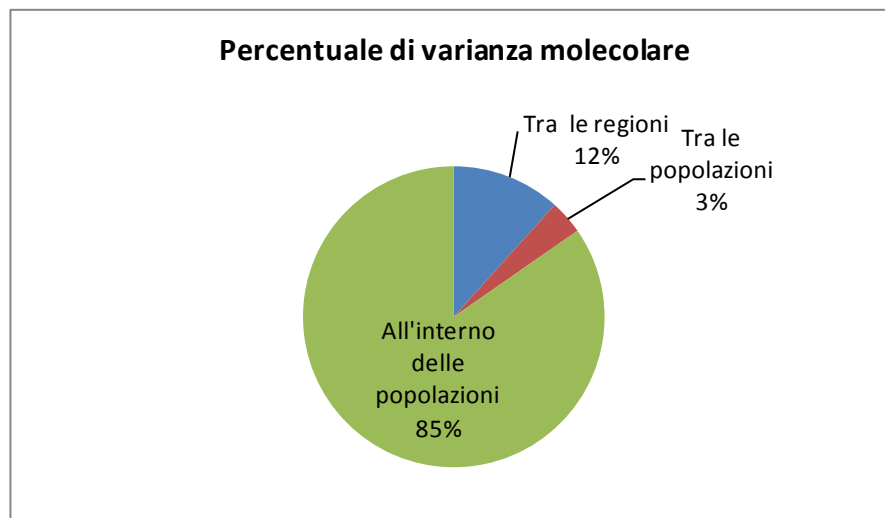


Fig.2: AMOVA test dell'ipotesi secondo la quale la popolazione PomiInt è da considerarsi differenziata dalle altre popolazioni studiate.

Struttura delle popolazioni

L'utilizzo di una procedura statistica descrittiva, l'analisi di corrispondenza fattoriale (ACF), ha permesso di ottenere una visualizzazione tridimensionale della distanza tra gli individui appartenenti ai differenti gruppi considerati. I gruppi Porporana (giallo) e Muzzana (blu) appaiono abbastanza distinti indicando che la provenienza dei campioni presenta delle peculiarità che prescindono dall'appartenenza tassonomica alla specie *minor* o *pumila* e che i complessi di specie nelle due differenti località hanno dei valori di frequenze alleliche abbastanza caratteristici.

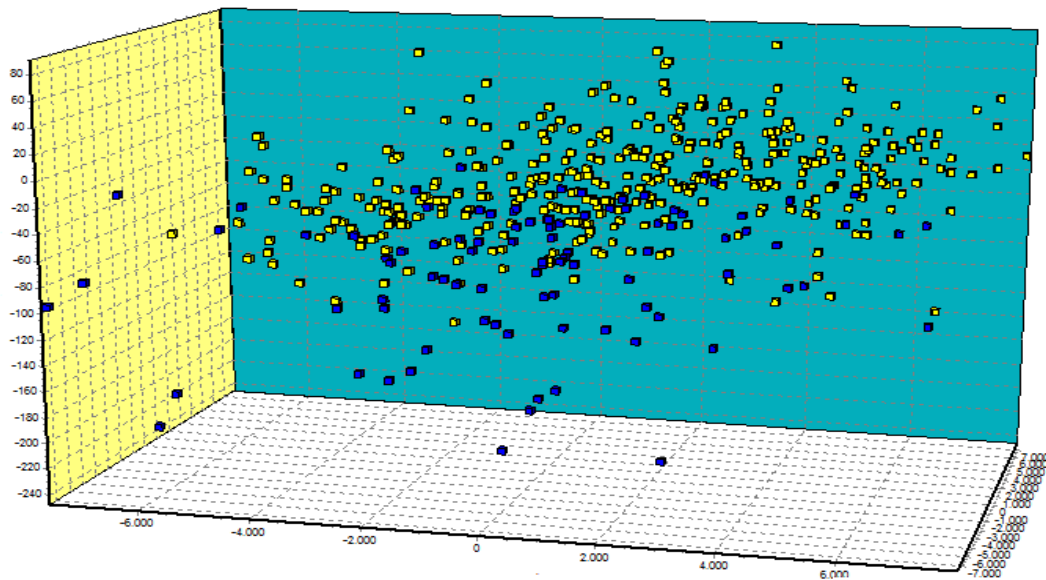


Fig.3: ACF per i gruppi Porporana, Muzzana..

L'analisi ripetuta sui gruppi *minor/pumila*/ibridi ha evidenziato che le due specie appaiono abbastanza distinte seppure con una parziale sovrapposizione. Il gruppo di campioni appartenenti al gruppo *minor* (giallo) ha una distribuzione più compatta a differenza di quelli appartenenti al gruppo *pumila* (viola). E' da notare come gli individui classificati come putativi ibridi (bianco) si collocano nella zona di sovrapposizione tra le distribuzioni tridimensionali dei campioni *minor* e *pumila*.

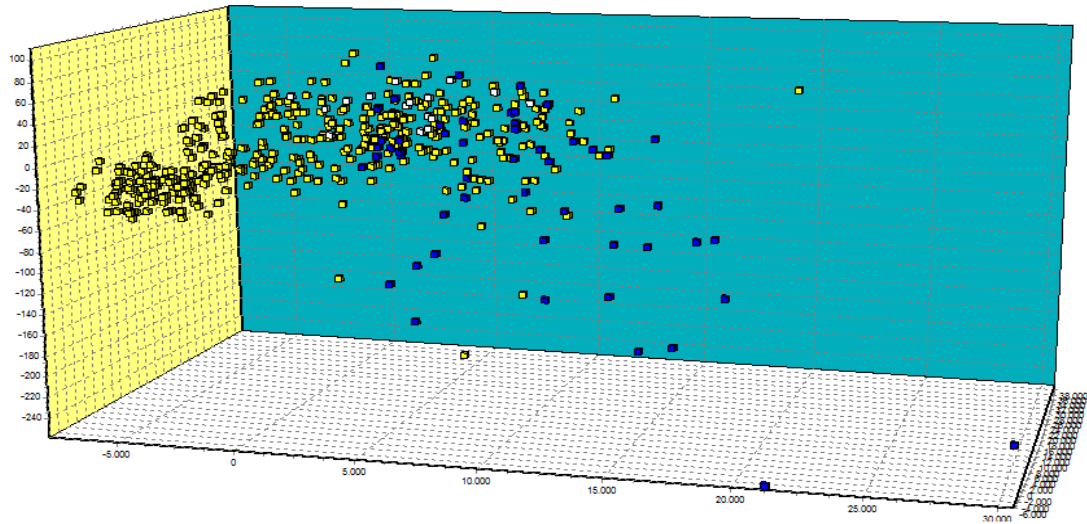


Fig.4 ACF per i gruppi *minor*, *pumila*, ibridi.

Il trattamento dei dati a cinque gruppi conferma la tendenza ad un certo raggruppamento dei campioni appartenenti ad un singolo gruppo pur con diffuse regioni di sovrapposizione con gli altri gruppi. PomiInt (giallo) e PomiEst (blu) appaiono contigui ma piuttosto distinti, Popu (bianco) ha un raggruppamento abbastanza diffuso e distinto dai precedenti, Mumi (grigio) è solo debolmente distinto da Mupu (fucsia) e pare essere abbastanza differente anche dagli altri gruppi che comprendono *Ulmus minor*.

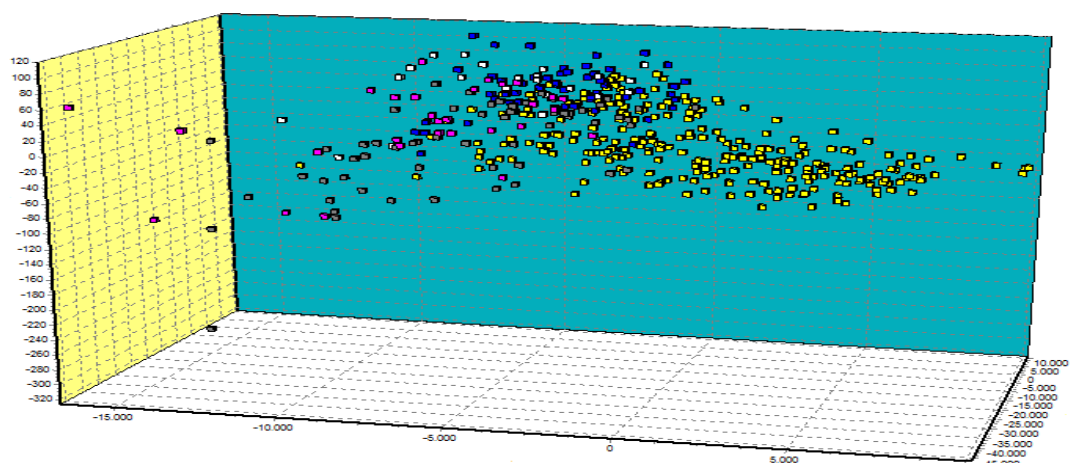


Fig.5: ACF per i gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu.

Un'analisi bayesiana, effettuata tramite il programma Structure 2.3.3, è stata eseguita sui campioni al fine di evidenziare la presenza di gruppi geneticamente omogenei. L'analisi mira a stimare il numero più probabile di pool genici ancestrali (K) da cui si può ipotizzare si siano originate le popolazioni attuali. Il valore più probabile di K è risultato essere K=2 (media $\text{LnP}(D)=-8990$, $\Delta K= 508,60$) suggerendo quindi l'esistenza di due pool genici originari. Come si può evincere dalla Fig.6 in tutti i gruppi considerati si ha una prevalenza di uno dei pool genici ancestrali (colorazione verde) mentre, all'interno del gruppo PomiInt si riscontra una frazione di campioni che si discostano nettamente dagli altri e per i quali prevale l'appartenenza all'altro pool genico originario (colorazione rossa). Si deduce quindi che l'analisi bayesiana non è in grado di fornire un criterio caratterizzante i differenti gruppi considerando l'evidenza che variazioni molto forti si riscontrano solamente all'interno di uno specifico gruppo mentre nel complesso i vari gruppi appaiono molto simili.

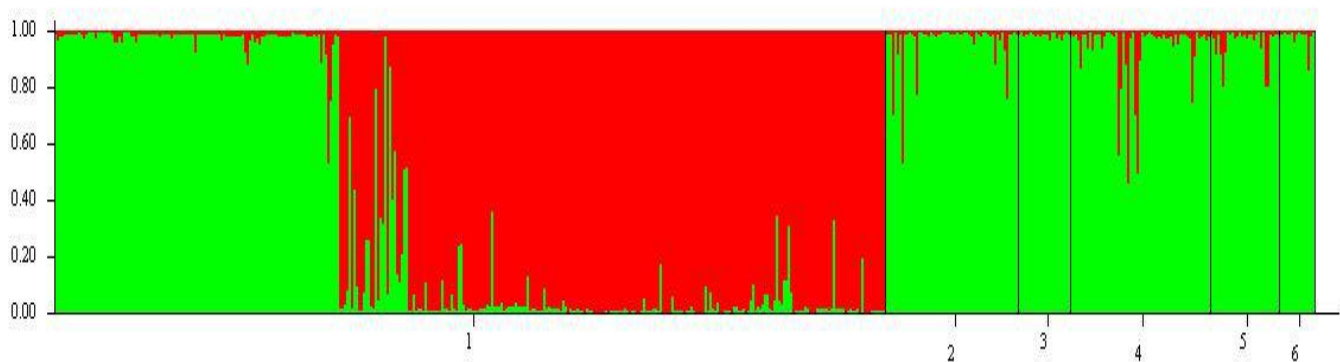


Fig. 6: Analisi bayesiana, con $K = 2$, per i gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mup ed ibridi indicati con un numero progressivo in ascissa. Ciascun albero è indicato da una barra verticale in cui le colorazioni rossa e verde indicano la frazione di ciascuno dei pool genici originari.

Un'analisi di autocorrelazione spaziale è stata effettuata per correlare le distanze genetiche con quelle geografiche ed evidenziare l'eventuale esistenza di una strutturazione genetica spaziale all'interno dei vari gruppi. Tra i cinque gruppi considerati solamente il nucleo interno di Porporana (PomiInt) ha evidenziato un autocorrelogramma significativo: il profilo mostrato in Figura 7 è del tipo stabilizzante ed indica significativa correlazione genetica tra gli alberi situati al di sotto dei 55 metri di distanza, distanza che costituisce il valore stimato del cosiddetto "patch genetico". Gli altri gruppi invece non esibiscono alcuna autocorrelazione significativa.

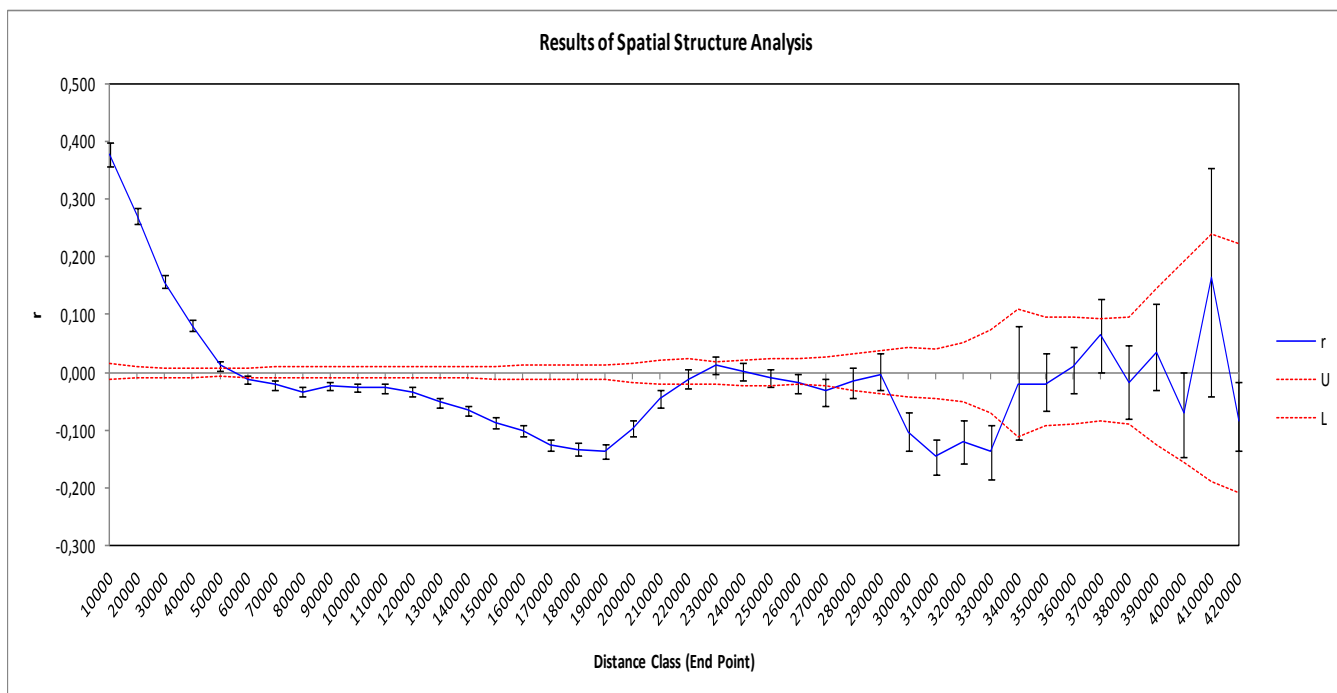


Fig.7. Autocorrelogramma relativo ai gruppi PomiInt, PomiEst, Popu, Mumi, Mupu.

DISCUSSIONE

Quercus cerris in Italia

In questo studio ventitré popolazioni di *Quercus cerris* di origine naturale, identificate nella penisola italiana ed in Sicilia, sono state analizzate utilizzando otto loci microsatelliti per evidenziare le variazioni genetiche, all'interno e tra le popolazioni, la loro struttura genetica e la dinamica evolutiva al fine di comprendere appieno il ruolo avuto dalla Penisola Italiana nel processo di ricolonizzazione postglaciale.

E' stato evidenziato che le popolazioni di cerro sottoposte ad indagine presentano un elevato grado di diversità genetica, in linea con quanto osservato in molte altre specie arboree (Hamrick *et al*, 1992): tutti e otto i loci analizzati sono risultati polimorfici (non si è riscontrata la fissazione di nessun allele) e la diversità genetica, misurata tramite i livelli di eterozigotità, appare piuttosto elevata. La media dei valori per H_e nelle ventitré popolazioni è infatti compresa nel range [0,65-0,85] non mostrando però nessun trend geografico apprezzabile. I valori ottenuti sono in linea con quanto riscontrato in popolazioni europee di *Q. petraea* e *Q. robur* (Muir *et al*, 2005) per le quali H_e è compresa nel range [0,30-0,96] ed è probabile che il range ridotto delle popolazioni italiane di cerro sia attribuibile alla ridotta copertura, con le popolazioni campionate, dell'areale naturale di questa specie. Lo stesso risultato si ottiene comparando i valori di eterozigotità del cerro con quelli ottenuti in uno studio precedente, su *Q. petraea* e *Q. robur* (Streiff *et al*, 1998), che ha utilizzato alcuni loci in parte comuni a quelli della presente ricerca: considerando infatti i loci MSQ4 ed MSQ13, utilizzati in entrambi gli studi, il livello di eterozigotità del cerro ($H_e = 0,27$) è inferiore a quello di *Q. robur* ($H_e = 0,79$) e di *Q. petraea* ($H_e = 0,85$).

La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è quasi esclusivamente associata con un significativo deficit di eterozigoti. Possibili spiegazioni chiamano in causa una selezione contro i genotipi eterozigoti o la presenza di alleli nulli che può aver portato ad una

generale sottostima dei valori di eterozigosità. E' da tenere presente che i loci utilizzati in questo studio sono stati derivati da specie vicine al cerro (*Q. macrocarpa*, *Q. petraea* e *Q. robur*) e, a posteriori, si è riscontrato che i loci derivanti da *Q. macrocarpa* (la specie filogeneticamente più distante) sono quelli che hanno mostrato i valori più bassi di H_e nelle popolazioni di cerro.

Il livello di linkage disequilibrium (LD) è stato saggiato per tutti le coppie di loci in tutte le popolazioni. Considerando il fatto che i loci microsatelliti scelti per questo studio mappano su differenti cromosomi in una mappa genetica composita della Fagaceae (Barreneche *et al*, 2004) si può ragionevolmente escludere che il fenomeno possa essere causato da una vicinanza fisica dei loci con conseguente trasmissione in blocco e scarsa frequenza di ricombinazione nella regione di DNA che li contiene. In termini generali i livelli di LD riscontrati non sono comunque particolarmente elevati e non possono essere attribuiti ad un evento recente di commistione tra diverse popolazioni, alla luce dei risultati dell'analisi bayesiana discussa successivamente. Considerando le dinamiche filogeografiche delle querce un LD rilevante potrebbe essere indicativo, per una data popolazione, nell'attribuire la caratteristica di potenziale rifugio glaciale ma in questo lavoro l'unica popolazione con un moderato livello di LD è MA e quindi, considerandone l'elevata latitudine, se ne può ragionevolmente escludere questo ruolo. Un'altra possibile causa del LD può essere la deriva genetica ma, alla luce del ridotto numero di loci utilizzati in questo studio, non si possono formulare ipotesi in tal senso in quanto una tale valutazione richiederebbe almeno venti loci per poter giungere a conclusioni più robuste (Piry *et al*, 1989).

I valori di divergenza genetica, come indicati dai valori di F_{ST} e R_{ST} tra coppie di popolazioni, non sono particolarmente elevati, ma significativamente diversi da zero nella grande maggioranza dei casi indicando che le popolazioni studiate sono abbastanza differenziate. L'osservazione che i valori di F_{ST} sono generalmente inferiori rispetto ai valori di R_{ST} delle coppie di popolazioni corrispondenti fa ipotizzare che le divergenze genetiche si siano originate in periodi abbastanza lontani in relazione alla storia naturale della specie. Questo è in accordo con un'ipotesi di ripopolamento della Penisola dopo il LGM, in quanto si può immaginare uno scenario in cui a partire da una o poche aree rifugio le popolazioni siano in seguito entrate in contatto su un areale abbastanza vasto, aumentando così i livelli di flusso genico tra le popolazioni stesse.

La struttura genetica delle popolazioni è stata studiata tramite l'utilizzo di un metodo bayesiano per giungere alla determinazione di K , il numero più probabile di popolazioni originarie dalle quali si è evoluto l'attuale assetto genetico. Nelle popolazioni di cerro è stato possibile stimare $K = 2$ come valore più probabile. Si può quindi interpretare tale dato ipotizzando che due pool genici omogenei abbiano contribuito alla struttura delle ventitré popolazioni campionate. Una rappresentazione geografica delle popolazioni non evidenzia però una demarcazione molto netta tra questi due ipotetici gruppi benché sia comunque riscontrabile un certo grado di strutturazione, in cui approssimativamente le popolazioni della fascia costiera adriatica risultano separate dalle rimanenti, con l'unica eccezione della popolazione di Vercelli. Si può quindi speculare che la colonizzazione della Penisola Italiana possa aver seguito essenzialmente due percorsi tuttavia non è ancora possibile delineare con certezza la loro origine. A tale proposito l'utilizzo di marcatori di tipo plastidiale, e quindi con ereditarietà uniparentale, potrà probabilmente chiarire adeguatamente questo aspetto. L'ipotesi di esistenza di due gruppi omogenei è stata ulteriormente rielaborata tramite l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) in cui si è saggiata l'esistenza delle due suddivisioni sopra citate. Ne è emerso come la variabilità genetica dovuta al differenziamento tra le due regioni contribuisca per una frazione significativa (16%), superiore anche a quella stimata mediante F_{ST} e R_{ST} , alla variabilità totale.

Il test di Mantel, che mira ad evidenziare fenomeni da isolamento da distanza, non è risultato significativo e pertanto le popolazioni oggetto di studio presentano un differenziamento che non è conseguente all'effetto congiunto della deriva genetica e della migrazione o da fenomeni correlati alla stessa. Anche questo dato può essere visto alla luce del ripopolamento della Penisola dopo il LGM; infatti si può interpretare il dato immaginando una situazione in cui l'espansione dell'areale non sia avvenuta seguendo un percorso lineare, oppure che più popolazioni rifugio abbiano contribuito, per cui ancora i flussi genici nelle regioni di contatto hanno eliminato gli effetti della deriva genetica.

Implicazioni per la conservazione

Il Cerro rappresenta una specie di grande valore ecologico e paesaggistico in Italia: basti solo ricordare la pletora di toponimi collegati (Cerro, Cerreto ecc.) in tutto il territorio. Basterebbe solo questo per considerarlo un'importante risorsa naturale, anche se in questo momento non particolarmente minacciata, pur con la riduzione progressiva dell'areale dovuta ad effetti antropici. Ma il Cerro presenta anche caratteristiche molto importanti dal punto di vista dell'evoluzione delle Fagaceae; si tratta infatti, nel genere *Quercus*, della specie di maggior rilievo al di fuori delle cosiddette "querce bianche", a cui appartengono tra l'altro la farnia, il rovere e la roverella. L'interesse di questo complesso di specie risiede nella ormai dimostrata capacità di fecondazione incrociata che dà origine ad ibridi fertili, rappresentando così un ottimo sistema di studio per l'evoluzione delle specie arboree. Per quanto a livello nucleare non siano stati ancora dimostrati fenomeni di ibridazione, la presenza di ibridi con la farnia è oggetto di dibattito e alcuni dati preliminari, basati sull'analisi del DNA plastidiale, sembrano indicare ibridazione con la sughera (Vendramin, com. pers.). Per tutti questi motivi è dunque necessario avere a disposizione dati circa la distribuzione e l'eventuale strutturazione della variabilità genetica del Cerro, e questo lavoro di tesi rappresenta il primo passo in questa direzione. Un altro punto fondamentale è rappresentato dalla ricostruzione delle rotte di ricolonizzazione seguite dalla specie dopo il LGM: a questo fine, risulta di fondamentale importanza l'utilizzo di marcatori ad eredità unilineare, che è già previsto come naturale continuazione di questo lavoro. L'identificazione di eventuali popolazioni rifugio e delle vie di espansione seguite dalla popolazioni di Cerro costituirà un'altra tappa importante verso la completa caratterizzazione genetica della specie, che a sua volta servirà come punto di partenza per la pianificazione di adeguate strategie per la conservazione e la valorizzazione di questa importante risorsa naturale.

Complesso *Ulmus minor/Ulmus pumila*

Due popolazioni naturali di *Ulmus minor*, in cui si è osservata la coesistenza con la specie aliena *Ulmus pumila*, sono state campionate in due differenti località della Pianura Padana e genotipizzate tramite l'utilizzo di sei loci microsatelliti, al fine di studiare l'assetto genetico di un complesso di due specie in cui la specie originaria (*U. minor*) è stata demograficamente decimata a seguito dell'introduzione di un ascomicete parassita, agente della grafiosi dell'olmo (*Ophiostoma ulmi* e *Ophiostoma novo-ulmi*), mentre la specie aliena (*U. pumila*) è risultata tollerante o resistente. Lo studio ha inteso altresì evidenziare la presenza di un'eventuale ibridazione tra le due specie, alla luce della resistenza alla grafiosi della specie aliena *U. pumila* e del fatto che sono osservabili parecchi individui con morfologie intermedie di difficile attribuzione tassonomica.

Le popolazioni sono state suddivise con differenti modalità, come descritto precedentemente, considerando l'appartenenza all'una o all'altra specie o caratteristiche fenologiche che porterebbero a considerare alcuni individui come potenziali ibridi. Ulteriori suddivisioni sono state fatte tenendo conto della particolare struttura ed origine delle popolazioni oggetto di studio.

La distribuzione di frequenza per i vari alleli, a differenza da quanto riportato in studi sul complesso *U. rubra/U. pumila* e sulla sola specie *U. pumila* (Zalapa *et al*, 2008, 2009, 2010) non è risultata nettamente differenziata e gli alleli esclusivi, sebbene presenti, presentano delle frequenze estremamente ridotte per cui non è opportuno utilizzare tali dati per discriminare l'appartenenza ad una determinata specie di olmo o lo status di ibrido. E' probabile che l'utilizzo di marcatori plastidiali potrà dare un contributo nella comprensione di questo fenomeno grazie al tipo di ereditarietà uniparentale. Il confronto con gli alleli riportati in letteratura per la specie *U. pumila* (Zalapa *et al*, 2008) ha evidenziato come le due popolazioni abbiano alcuni alleli non presenti in quelle dello studio sopra citato e viceversa. Non sono disponibili dati in letteratura per la specie *U. minor* per cui non è stato possibile operare un confronto.

Il range dei valori di H_e , mediato per tutte le popolazioni e tutti i loci, è compreso nell'intervallo [0,67-0,74] e tale intervallo appare più elevato del range riscontrato per il complesso *U. rubra/U. pumila* [0,26-0,67] in un precedente studio (Zalapa *et al*, 2009). Tale dato deve essere interpretato con cautela e solo come termine di paragone in

quanto, benché l'ecologia possa essere molto simile, il complesso di specie è differente (*U. minor/U. pumila* e *U. rubra/U. pumila*) ed inoltre i loci utilizzati sono solo in parte gli stessi. Un intervallo leggermente più ampio [0,36-0,74] è stato riportato, limitatamente ad *U. pumila*, in un altro studio (Zalapa *et al*, 2008). I valori di eterozigotità non variano molto, anche considerando i valori della suddivisione a cinque gruppi, e rimangono sempre incentrati su un range di valori medio alti [0,63-0,54].

I test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg hanno messo in luce una diffusa situazione di significativo scostamento dalle condizioni di equilibrio pressoché per tutte le suddivisioni. In entrambe le specie sono presenti gruppi totalmente al di fuori dell'equilibrio segnatamente a tutti i loci considerati ma, inaspettatamente, il gruppo dei putativi ibridi presenta tre loci su sei totali in condizioni di equilibrio. Benché questo gruppo sia costituito da soli quindici individui tale dato è da tenere in considerazione. Lo scostamento dalle condizioni di equilibrio non è stato riportato in studi analoghi precedentemente citati (Zalapa *et al*, 2008, 2009). Una possibile spiegazione di questa discrepanza è che il complesso italiano sia stato pesantemente affetto dalle alterazioni conseguenti all'introduzione della grafiosi ad un livello probabilmente più elevato di quanto avvenuto nelle popolazioni del nord America. L'assenza di condizioni di equilibrio nei gruppi italiani comprendenti la specie *U. pumila* invece è teoricamente imputabile all'introduzione recente di questa specie, che non ha ancora raggiunto una condizione di relativa stabilità genetica, e che si può annoverare tra la categoria delle specie invasive (a maggior ragione dopo il declino demografico dell'olmo campestre a seguito delle epidemie di grafiosi) e quindi in forte espansione. Questa ipotesi è corroborata dal fatto che le popolazioni di *U. pumila* all'equilibrio provengono da accessioni cinesi dagli areali originari, in cui la specie si trova probabilmente in condizioni di equilibrio.

Il fenomeno di linkage disequilibrium (LD) è stato evidenziato in modo molto marcato nel complesso di Porporana (quattordici su quindici coppie di loci con disequilibrium) ed in maniera più ridotta nel complesso di Muzzana (quattro coppie su quindici). Un'analisi più dettagliata evidenzia però come il fenomeno sia strettamente limitato al nucleo interno di Porporana. È quindi ragionevole ipotizzare che la condizione di LD non sia imputabile all'effetto dell'epidemia di grafiosi né all'influenza del flusso genico della

specie aliena ma derivi piuttosto da particolarismi locali di questa popolazione (ad esempio un forte effetto del fondatore, anche sotto forma di collo di bottiglia).

Le statistiche di Fisher, ed in particolare il valore medio del parametro F_{IS} pari a 0,244, indicano la presenza di un moderato livello di inbreeding, attribuibile essenzialmente ad un eccesso di omozigoti, all'interno delle sottopopolazioni. E' molto probabile che questo dato sia associato alla dimensione ridotta delle popolazioni (nuclei pionieri o frammentati in terreni agricoli oppure stazioni molto piccole ed isolate) od anche al ridotto flusso genico (ipotesi da confermare tramite l'analisi dei flussi genici nelle progenie). Non si può escludere che la selezione contro determinati genotipi, a seguito dell'epidemia di grafiosi, possa avere svolto un certo ruolo nell'elevare il livello di inbreeding ma questo non pare in linea con i dati della distribuzione del linkage disequilibrium nei vari gruppi che sono stati tutti ugualmente esposti all'epidemia. L'utilizzo di marcatori molecolari non neutri, come geni coinvolti nella resistenza o tolleranza al patogeno, potrà dare un contributo significativo nel tentativo di discriminare gli effetti di una particolare ecologia e demografia da quelli di una selezione direzionale più o meno forte indotta dal patogeno e dall'effetto dell' eventuale ibridazione.

Il differenziamento delle popolazioni è stato quantificato tramite la stima dei parametri genetici F_{ST} e R_{ST} per ciascuna coppia di popolazioni. Ne è emerso che il complesso di Porporana è scarsamente differenziato da quello di Muzzana ma che il dato è statisticamente significativo ($F_{ST} = 0,064$, $R_{ST} = 0,089$). Nella suddivisione in funzione della specie i gruppi *minor* e *pumila* mostrano un livello di differenziamento leggermente più elevato ma il livello di differenziamento tra il gruppo *pumila* e quello dei putativi ibridi risulta solo in parte significativo ($F_{ST} = 0,026$, $R_{ST} = ns$). Questo dato mette in luce come la popolazione dei putativi ibridi possa essere in realtà costituita da individui della specie *U. pumila* che presentino però un fenotipo estremo. Dato che con il set di marcatori utilizzati in questo studio non è stato possibile identificare molecolarmente gli ibridi appare di capitale importanza l'utilizzo di altri loci o di marcatori plastidiali. Nella suddivisione a sei gruppi la popolazione che più si distingue dalle altre è rappresentata da PomiInt e questo dato corrobora le considerazioni precedenti sulla peculiarità della stessa anche se il test, tramite una procedura di AMOVA, di maggiore differenziamento di questo gruppo rispetto agli altri (raggruppati

in un'unica regione) ha evidenziato che la componente di differenziamento attribuibile alla variabilità all'interno delle regioni è molto superiore a quella tra regioni. Il fatto che il grado di differenziamento all'interno di gruppi appartenenti alla stessa specie sia paragonabile a quello con la popolazione PomInt, associato all'osservazione che il gruppo dei putativi ibridi appare scarsamente distinto dagli altri (a parte con i gruppi PomInt e Mupu), sottolinea però come il potere risolutivo del set di marcatori utilizzati risulti insufficiente quando l'analisi si spinge a considerare le differenze tra gruppi più specifici.

L'analisi di corrispondenza fattoriale ha messo in evidenza l'esistenza di peculiarità locali, legate alla provenienza dei campioni, piuttosto forti se paragonate all'appartenenza tassonomica degli stessi. Il range di variabilità della specie *U. pumila*, evidenziato con questa statistica descrittiva, appare essere più ampio in confronto alla dispersione dei dati di *U. minor* che risulta leggermente più ridotta. Viene confermata la peculiarità della popolazione PomInt e, dato molto interessante, la popolazione dei putativi ibridi è situata nella zona di sovrapposizione delle distribuzioni delle specie *U. minor* e *U. pumila*.

L'analisi bayesiana ha messo in luce che il valore $K = 2$ è il più probabile e pertanto si può ipotizzare che le attuali popolazioni si siano originata dal rimescolamento di due pool genici ancestrali. In generale però solamente uno dei due pool genici ha una prevalenza molto forte ed inaspettatamente si riscontra la forte preponderanza dell'altro all'interno di uno specifico gruppo: PomInt. Questo dato, oltre a sottolineare la forte peculiarità di questa popolazione, evidenzia che, benché il set di marcatori utilizzato manifesti una scarsa risoluzione ad un livello di indagine approfondito, i particolarismi locali delle singole popolazioni possono dare luogo a differenze molto marcate, anche molto superiore a quelle che ci si aspetterebbe di trovare tra gruppi botanicamente od ecologicamente più distinti.

Al fine di evidenziare l'esistenza di particolari strutture genetiche spaziali le varie popolazioni (con l'eccezione di quella dei putativi ibridi, costituita da provenienze di Porporana e di Muzzana) sono state sottoposte ad un'analisi di autocorrelazione spaziale. Ne è emerso che solo il gruppo PomInt ha una forte strutturazione con elevata correlazione genetica tra gli individui distanti meno di 55 metri. L'assenza di strutturazione negli altri gruppi è probabilmente attribuibile alla mancanza di un tempo

sufficiente all'instaurazione della stessa (per la specie aliena *U. pumila*) ed al fatto che il mantenimento di un elevato e significativo livello di strutturazione genetica rimane prerogativa di vere e proprie formazioni boschive (come lo è quella costituita dal gruppo PomiInt) e non è compatibile con nuclei pionieri o frammentati.

Implicazioni per la conservazione

Anche per l'Olmo valgono le stesse considerazioni di carattere generale già fatte a proposito del Cerro: anche l'Olmo infatti rappresenta una specie di elevata importanza paesaggistica rappresentativa di un genere costituito da un numero di specie molto ridotto. Inoltre, nel caso dell'Olmo, valgono anche considerazioni legate all'aspetto di conservazione assai più gravi di quelle del Cerro. L'avvento della grafiosi ha infatti costituito un evento tragico per questa specie, che ha visto la perdita di numerosissime popolazioni. Questo, unito al ripopolamento, avvenuto in un periodo in cui non ci si preoccupava troppo delle conseguenze ecologiche (e tantomeno genetiche) dell'introduzione di specie alloctone, effettuato con la specie congenere siberiana, ha fatto sì che possiamo considerare le popolazioni italiane di Olmo fortemente minacciate. La ricerca effettuata assume quindi grande valore sotto l'aspetto della conservazione delle risorse genetiche: l'individuazione di popolazioni "pure" di *U. minor* garantirebbe un serbatoio di variabilità genetica tipica della specie per scopi di ripopolamento e/o di reintroduzione.

Ma anche nel caso dell'Olmo considerazioni evolutive si intrecciano con quelle conservazionistiche. La possibilità di ibridazione con *U. pumila* apre infatti la strada allo studio di una serie di tematiche concernenti l'evoluzione delle Ulmaceae e l'introggressione selettiva di geni per la resistenza ai patogeni dalla specie resistente a quella sensibile. A questo proposito nelle nostre popolazioni è in corso l'analisi del flusso genico interspecifico, mediante analisi della progenie di tutti gli alberi della popolazione del nucleo interno di Porporana, effettuata raccogliendo ed analizzando la progenie in due anni consecutivi. In questo modo sarà possibile identificare i contributi paterni, valutando così parametri come l'intensità del flusso pollinico e la capacità competitiva del polline di specie diverse. Anche questo dato servirà a scopi conservazionistici,

indicando ad esempio il raggio entro il quale le due specie non debbano essere piantate assieme per conservarne l'integrità genetica. Purtroppo non è stato possibile riportare in questo lavoro di tesi i primi dati relativi, a causa dell'impegno temporale previsto per questo tipo di analisi.

BIBLIOGRAFIA

Abbate G., Alessandrini A., Blasi C., Conti F. 2005.

An annotated checklist of the Italian vascular flora.

Palombi Editori, Roma.

H. Andren

Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review.

Oikos (1994) 71, 355-366.

L. L. Andreson, F. S. Hu, D. M. Nelson, R. J. Petit and K. N. Paige

Ice-age endurance: DNA evidence of a white spruce refugium in Alaska.

PNAS (2006) 103, 12447-12450.

E. J. Baack and L. H. Rieseberg

A genomic view of introgression and hybrid speciation.

Current opinion in genetics & development (2007) 17, 513-518.

N. H. Barton and M. Slatkin

A Quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population.

Heredity (1986) 56, 409-415.

T. Barreneche , M. Casasoli, K. Russel, A. Akkak, H. Meddour, C. Plomion, F. Villani and A. Kremer
Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs).
Theoretical and Applied Genetics (2004) 108, 558-566.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F.

GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire
Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier
(France). 1996-2000.

D. H. Boshier, J. E. Gordon and A. J. Barrance

Prespects for *circa situm* tree conservation in Mesoamerican dry forest agroecosystems.
University of California press, Berkeley California (2004).

S. Bottema and W. Van Zeist

Late Quaternary Vegetation of the Near Est Beihefte Zum Tubineger Atlas Des Vorderen Orients.
Reihe (Naturwissenschaften) (1991) 18, 156.

C. M. Brasier

Inheritance of pathogenicity and cultural characteristics in *Ceratocystis ulmi*. Hybridization of
protoperithecial and non aggressive strains.
Transactions of the British Mycological Society (1977) 68, 45-52.

C. M. Brasier

Intercontinental spread and continuing evolution of the Dutch elm disease pathogens.
The elms: breeding, conservations and disease management (2000) 61-72. Kluwer academic
publishers, Boston.

C. M. Brasier

Ophiostoma novo-ulmi sp. Nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics.

Mycopathologia (1991) 115, 151-161.

S. Brewer, R. Cheddadi, J. L. de Beaulieu and M. Reille

The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period.

Forest Ecology and Management (2002) 156, 27-48.

J. Clark, M. Silman, R. Kern, E. Macklin and J. HilleRisLambers

Seed dispersal near and far: patterns across temperate and tropical forests.

Ecology (1999) 80, 1475-1494.

J. S. Clark, M. Lewis and L. Horvath

Invasion by extremes: population spread with variation in dispersal and reproduction.

American Naturalist (2001) 157, 537-554.

C. Collada, P. Fluentes-Utrilla, L. Gill and M. T. Cerverea

Characterization of microsatellite loci in *Ulmus minor* Miller and cross-amplification in *U. glabra* Hudson and *U. laevis* Pall.

Molecular Ecology Notes (2004) 4, 731-732.

T. M. Crowley, M. S. Muralitharan and T. W. Stevenson

Isolating Conifer DNA: a Superior Polysaccharide Elimination Method.

Plant Molecular Biology Reporter (2003) 21, 97a-97d.

B. Degen, L. Blanc, H. Caron, L. Maggia, A. Kremer and S. Gourlet-Fleury

Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species.

Biological Conservation (2006) 131, 386-401.

M. E. Dodd and J. Silvetown

Size-specific fecundity and the influence of life time size variation upon effective population size in *Abies balsamea*.

Heredity (2000) 85, 604-609.

B. D. Dow and M. V. Ashley

High Levels of Gene Flow in Bur Oak Revealed by Paternity Analysis using microsatellites.

Journal of Heredity (1998) 89, 62-70.

B. D. Dow, M. V. Ashley and H. F. Howe

Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak (*Quercus macrocarpa*).

Theoretical and Applied Genetics (1995) 91, 137-141.

S. Dumolin-Lapègue, B. Demesure and R. J. Petit

Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method.

Theoretical and Applied Genetics (1995) 91, 1253-1256.

S. Dumolin-Lapègue, A. Kremer and R. J. Petit

Are chloroplast and mitochondrial DNA variations specie-independent in oaks?

Evolution (1999a) 53, 1406-1413.

D. Grivet, M. F. Deguilloux, R. J. Petit and V. L. Sork

Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) and California and Europe.

Molecular Ecology (2006) 15, 4085-4093.

B. L. Gross and L. H. Rieseberg

The Ecological Genetics of Homoploid Hybrid Speciations.

Journal of Heredity (2005) 96 (3), 241-252.

A. T. Groover

What genes make a tree?

Trends in Plant Science (2005) 10, 210-214.

S. W. Guo, Thompson E. A.

Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles

Biometrics (1992) 48, 361-72.

G. Evanno, S. Regan and J. Goudet

Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.

Molecular Ecology (2005) 14, 2611-2620.

Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W.

Factors influencing genetic diversity in woody plant species.

New Forests (1992) 6, 95-124.

O. Honnay and H. Jacquemyn

Susceptibility of Common and Rare Plant Species to the Genetic Consequences of Habitat Fragmentation.

Conservation Biology (2007) 21 n.3, 823-831.

T. Kenta and Y. Isagi, M. Nakagawa, M. Y. Amashita and T. Nakashizuka

Variation in pollen dispersal between years with different pollination conditions in a tropical emergent tree.

Molecular Ecology (2004) 13, 3575-3684.

A. T. Kramer, J. L. Ison, M. V. Ashley and H. F. Howe

The Paradox of Forest Fragmentation Genetics.

Conservation Biology (2008) 22 n.4, 878-885.

D. T. Lester and E. B. Smalley

Improvement of elms through interspecific hybridization with Asian species.

Proceedings of IUFRO-SABRAO symposium for tree breeding government exp. Stn. Japan (1972a), 1-10.

C. Lexer, A. Kremer and R. J. Petit

Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism.

Molecular Ecology (2006) 15, 2007-2012.

Y. B. Linhart

Variation in woody plants: molecular markers, evolutionary processes and conservation biology.

Molecular Biology of woody plants 1999 (book) ed. S. M. Jain and S. C. Minocha 64, 341-374
Dordrecht: Kluwer Acad.

X. F. Ma, A. E. Szmidt and X. R. Wang

Genetic Structure and Evolutionary History of a Diploid Hybrid Pine *Pinus densata* Inferred from the Nucleotide Variation at Seven Gene loci.

Molecular Biology and Evolution (2006) 23 (4), 807-816.

N. Mantel

The detection of disease clustering and a generalized regression approach.

Cancer Research (1967) 27 (2), 209-220.

J. S. McLachlan, J. S. Clark and P. S. Manos

Molecular indicators of tree migration capacity and rapid climate change.

Ecology (2005) 86, 2088-2098.

G. Muir and C. Schlotterer

Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oak (*Quercus* spp.).

Molecular Ecology (2005) 14, 549-561.

J. D. Nason and J. L. Hamrick

Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees.

Journal of Heredity (1997), 264-276.

H. Nybon

Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants.

Molecular Ecology (2004) 13, 1143-1155.

L. R. Nielsen and E. D. Kjaer

Gene flow and mating patterns in individuals of wych elm (*Ulmus glabra*) in forest and open land after the influence of Dutch elm disease.

Conservation Genetics (2010) 11, 257-268.

Peakall R., Smouse P.E,

GenALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research.

Molecular Ecology Notes 2006 (6): 288-295.

R.J. Petit, S. Brewer, S. Bordacs *et al.*

Identification of refugia and post glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence.

Forest Ecology and Management (2002a) 156, 49-74.

R.J. Petit, U. M. Csaikl, S. Bordacs *et al.*

Chloroplast DNA variation in European white oaks-Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations.

Forest Ecology and Management (2002b) 156, 05-26.

R. J. Petit

Biological invasions at the gene level.

Diversity and distributions (2004) 10, 159-165.

R. J. Petit, R. Bialozyt, P. Garnier-Géré and A. Hampe

Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations.

Forest Ecology and Management (2004) 197, 117-137.

R. J. Petit, C. Bodénès, A. Ducousso, G. Rousell and A. Kremer

Hybridization as a mechanism of invasion in oaks.

New Phytologist (2003) 161, 151-164.

R. J. Petit and A. Hampe

Same Evolutionary Consequences of Being a Tree.

The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic (2006) 37, 187-214.

S. Piry, G. Luikart and J. M. Cornuet.

BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data.

The Journal of Heredity (1989) 90, 502-503.

S. Porebski, L. Grant-Bailey and B. R. Baum

Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components.

Plant Molecular Biology Reporter (1997) 15 (1), 8-15.

J. K. Pritchard, M. Stephens and P. Donnelly

Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data .

Genetics (2000) 155, 945-959.

A. Santini, A. Montaghi, G. G. Vendramin and P. Capretti

Analysis of the Italian Dutch Elm Disease fungal population.

Phytopatology (2005) 153, 73-79.

A. Solla, J. Bohnens, E. Collin, S. Diamandis, A. Franke, L. Gil, M. Buròn, A. Santini, L. Mittempergher, J. Pinon and A. V. Broeck.

Screening European elms for resistance to *Ophiostoma novo-ulmi*.

Forest Science (2005) 51 (2), 134-141.

M. Schuelke

An economic method for the fluorescence labeling of PCR fragments.

Nature Biotechnology (2000) 18.

M. Slatkin

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

F. C. Sorensen

Relationship between self-fertility, al location of growth, and inbreeding depression in tree
coniferous species.

Evolution (1999) 53, 417-425.

F. C. Sorensen

Effect of population outcrossing rate on inbreeding depression in *Pinus contorta* var. *murrayana*
seedlings.

Scandinavian Journal of Forest Research (2001) 16, 391-403.

V. L. Sork and P. E. Smouse

Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations.

Landscape Ecology (2006) 21, 821-836.

R. Streiff, T. Labbe, R. Bacilieri, H. Steinkellner, J. Glossl and A. Kremer

Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites.

Molecular Ecology (1998) 7, 317-328.

J. C. Svenning and F. Skov

Could the tree diversity pattern in Europe be generated by post glacial dispersal limitation?

Ecology Letters (2007) 10, 453-460.

P. Taberlet, L. Fumagalli, A. G. Wust-Saucy and J. F. Cosson

Comparative phylogeography and post glacial colonization routes in Europe.

Molecular Ecology (1998) 7, 453-464.

P. Vakkari, M. Rusanen and K. Karkkainen

High genetic differentiation in marginal populations of European white elm (*Ulmus laevis*)

Silva Fennica (2009) 43 2, 185-196.

M. Vellend, K. Verheyen, K. M. Flinn, H. J. Jacquemyn, A. Kolb, H. Van Calster, J. Peterken, B. J. Graae, J. Bellemare, O. Honnay, J. Brunet, M. Wulf, F. Gerhardt and M. Hermy

Homogenization of forest plant communities and weakening of species-environment relationships via agricultural land use.

Journal of Ecology (2007) 95, 565-573.

J. K. Ward, J. M. Harris, T. E. Cerling, A. Wiedenhoeft and M. J. Lott

Carbon starvation in glacial trees recovered from the La Brea tar pits, southern California.

PNAS (2005) 102, 690-694.

B. S. Weir, C. C. Cockerham

Estimating F-statistics for the analysis of population structure.

Evolution (1984) 38 (6), 1358-1370.

R. E. Whiteley, S. Black-Samuelsson and D. Clapham

Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*.

Molecular Ecology Notes (2003) 3, 598-600.

Q. Y. Xiang, W. H. Zhang, R. E. Ricklefs, H. Qian and Z. D. Chen

Regional differences in rates of plant speciation and molecular evolution: a comparison between Eastern Asia and Eastern North America.

Evolution (2004) 58, 2175-2184.

J. E. Zalapa, J. Brunet and R. P. Guries

Genetic diversity and relationships among Dutch elm disease tolerant *Ulmus pumila* L. accessions from China.

Genome (2008) 51, 492-500.

J. E. Zalapa, J. Brunet and R. P. Guries

Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.).

Molecular Ecology Notes (2007).

J. E. Zalapa, J. Brunet and R. P. Guries

Patterns of hybridization and introgression between invasive *Ulmus pumila* (ulmaceae) and native *U. rubra*.

American Journal of Botany (2009) 96 (6), 1116-1128.

J. E. Zalapa, J. Brunet and R. P. Guries

The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (ulmaceae).

Evolutionary Applications (2010) 3, 157-168.

RINGRAZIAMENTI

Desidero anzitutto ringraziare l'amministrazione del CNBF di Peri, e gli uffici del CFS ad essa collegati, per aver supportato questa ricerca. In particolare il direttore del CNBF di Peri, il Dr. Fabio Gorian, per aver suggerito la popolazione di olmo di Porporana come candidato ideale per questo studio, scelta che a posteriori si è effettivamente interessante.

E' solo grazie alla disponibilità del mio tutor, il Prof. Alessandro Camussi, che ho potuto partecipare a questo dottorato: grazie al suo interessamento e disponibilità, assieme a quelli della coordinatrice dei dottorandi, la Prof. M.L. Racchi, è stato possibile far sì che gli inevitabili problemi, che lo status di dottorando fuori sede comporta, non fossero insormontabili. Devo inoltre ringraziarli per aver messo a mia disposizione il laboratorio Genexpress di Sesto Fiorentino.

Senza la presenza ed il continuo supporto del mio co-tutor, il Prof. Giorgio Binelli, non credo sarebbe stato nemmeno concepibile intraprendere questo dottorato: non è davvero possibile immaginare di lavorare con un miglior referente scientifico e la gratitudine e la profondissima stima che nutro nei suoi confronti non è in alcun modo descrivibile in queste poche righe.

Un grazie speciale va alla Dr. Isabella Vanetti per il fondamentale aiuto nella fase di elaborazione dei dati e per tutti gli utili scambi di opinioni che mi hanno facilitato grandemente il lavoro. Devo ringraziare anche il Dr. G.G. Vendramin, per avermi supportato sia scientificamente che logisticamente nelle mie innumerevoli visite a Genexpress. Lo stesso vale per il Dr. F. Sebastiani e per la Dr. A. Buonamici.

E' solo grazie alla mia collega, la Dr. Luisa Zago, che la ricerca ha potuto proseguire in maniera sostenibile: non fosse stato per lei la notevole mole di lavoro mi avrebbe quasi sicuramente schiacciato. Un grazie particolare va al Dr. Lorenzo Gui per le sue acute osservazioni botaniche ed ecologiche nonché per il supporto logistico nelle varie uscite dedicate ai campionamenti. Ringrazio anche la geom. Cristina Coati per aver sovrinteso le operazioni di georeferenziazione e di elaborazione dei dati geografici. Anche il personale operario di Peri ha giocato un ruolo chiave nelle operazioni di campionamento: un grazie particolare a Riccardo Valentini, Alessio Salvetti ed al compianto Moreno Toccolini.

Infine un grazie speciale va ai miei genitori, che mi hanno sempre sostenuto ed incoraggiato, e a tutti gli amici e amiche che ho avuto la fortuna di avere al mio fianco in questi anni.