

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1. Analisi dei loci aploidi

#### *3.1.1. Distribuzione geografica degli alleli citoplasmatici*

Per quanto riguarda la distribuzione geografica degli alleli citoplasmatici nello spazio, cioè dei marcatori genetici trasmessi solo per via materna e quindi tramite la dispersione dei semi, il numero totale di sotto-gruppi genetici (“cluster”) individuati in questo studio è pari a 8 (Mappe B, C, D, negli allegati).

Il numero minimo di aplotipi, 1, è presente nel campione di Stavanger (Nord Europa, Mappa B), nella Foresta Umbra (Gargano, Mappa C) e nei seguenti boschi della Basilicata: 5, 6, 8 (Basilicata Nord Occidentale, Mappa F), 9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-21-22-23-24 (Basilicata Centrale, Mappa G), 25-26-27-28 (Basilicata Sud Occidentale, Mappa H) e a Terranova del Pollino (31) nella Basilicata Meridionale (Mappa I, negli allegati).

Prima di continuare con la descrizione dei risultati è opportuno chiarire che ogni cluster è identificato da un binomio colore-numero rappresentato nelle specifiche legende delle cartine, mentre ogni sub-popolazione di faggio da un numero naturale crescente di colore rosso.

I popolamenti che presentano due cluster sono: il Massiccio degli Alburni (33) e Monte Gelbison (35) nel Parco nazionale del Cilento (Mappa L, M), 2-3-4-7 nella Basilicata Nord Occidentale (Mappa F), 29 e 30 nella Basilicata Meridionale (Mappa I). Le sub-popolazioni con 3 gruppi citoplasmatici sono 1-20-32 appartenenti alla Basilicata (Mappa D), mentre il Monte del Cervati (34) ne presenta 4 (Mappa M) e solamente l’Etna 5 (Mappa C).

Per la descrizione dei “risultati citoplasmatici” è stato usato il criterio secondo il quale un gruppo può essere ampiamente o localmente distribuito e all’interno di questa distribuzione comune o raro (Pomarico et al. 2007). Il gruppo 1-blu risulta ampiamente distribuito e comune nella Basilicata e nel Parco del Cilento ma completamente assente sull’Etna, sul Gargano ed in Norvegia (Mappa D, C).

Il cluster 2-fuksia è localmente distribuito e raro nella Basilicata Meridio-

nale (Massiccio del Pollino, Terranova del Pollino, Mappa I), sul Monte Madonna di Viggiano (20) e sul Monte Cervati (34).

Il sotto-gruppo 3-verde è ampio e comune nella Basilicata Nord Occidentale, nella Basilicata Meridionale, nel Cilento, nel Gargano ed in Norvegia. Il gruppo 4-giallo è localmente distribuito e comune nella faggeta di Moliterno (25), sul Massiccio del Pollino (32) e sul Monte Gelbison (35), mentre risulta raro sul Monte Vulture (1) e sul Monte Vettrice (7). Il cluster 5-arancione è presente solamente a Pietra Iaccata Sud (24) e sull'Etna. Il sotto-gruppo 6-nero è localmente distribuito e comune sul Monte Cervati (34) ma completamente assente negli altri popolamenti. I gruppi 7 e 8 sono rari e presenti solamente sull'Etna, risultando praticamente assenti nelle altre popolazioni.

Le frequenze degli aplotipi più diffusi 1-blu e 3-verde sono rispettivamente del 42.1% e 41.5%, invece gli aplotipi meno diffusi 7 e 8 sono osservati solamente in Sicilia con una frequenza uguale dello 0.2% (Tabella B<sub>1</sub>).

Una differenziazione genetica significativa ( $F_{st}$ ) per marcatori citoplasmatici tra boschi è risultata uguale a 0,725, mentre tra comprensori è di 0,338 (Tabella G).

La differenziazione di 0,855, per marcatori cloroplastici tra popolazioni dislocate lungo tutta la penisola italiana, è quella misurata dal parametro  $G_{st}$  in un altro studio in letteratura (Vettori et al. 2004).

Per la distribuzione geografica degli alleli citoplasmatici si osservano trend a livello di macroscale (riduzione da Sud vs Nord), mentre a livello sito specifico e di comprensorio si osserva una distribuzione molto localizzata di ricchezza di aplotipi (Vulture, Gelbison, Caldarosa-Iaccata, M. M. Viggiano, Pollino).

Questo pattern, così come suggerisce Magri (2006), può indicare che le popolazioni sopravvissute alle ultime glaciazioni sono geneticamente e diversamente sopravvissute in siti multipli. Ma resta da comprendere come l'aplotipo 3-verde sia arrivato in Norvegia, ricolonizzata alla fine delle glaciazioni da un rifugio diverso da quello italiano secondo Magri et al (2006). È pur vero che questo aplotipo è il più diffuso nelle aree studiate, ma potrebbe anche supportare l'ipotesi di una eventuale connessione durante il Pliocene tra la penisola italiana e quella Balcanica, confermata da analisi con isoenzimi (Gomory 1999, citato da Vettori 2004).

La presenza di alleli unici può essere determinata dagli eventi storici del passato e dall'orografia del territorio. In ogni modo, il numero di sottogruppi osservati concorda con i risultati di altri studi che dimostrano una più elevata diversità nelle popolazioni del Sud Italia (Taberlet 1998, Magri 2006).

## 3.2. Analisi dei loci nucleari

### 3.2.1. Valutazione della struttura genetica

Per quanto riguarda la descrizione dei risultati sulla diversità genetica per i loci diploidi, il criterio adottato è stato quello di considerare tre fonti di variazione: la diversa aggregazione delle popolazioni tra di loro in base a condizioni eco-geografiche simili, la categoria fisionomica ed infine l'altitudine. I parametri che caratterizzano la struttura genetica sono stati valutati quindi, per comprensori, per popolazioni ecogeografiche o boschi e all'interno di questi tra generazione parentale e filiale (dove quest'ultima è presente), per categorie fisionomiche e per classi di altitudine.

La differenziazione genetica ( $F_{st}$ ) tra i diversi aggregati di popolazioni definite *a-priori* ed, infine il flusso genico ( $Nm$ ) tra comprensori e tra boschi entro ciascun comprensorio sono stati stimati per i 5 loci microsatelliti nucleari. Considerando come prima fonte di variazione, l'aggregazione a livello di comprensorio, il valore più basso dell'indice di fissazione ( $F_{is}$ ) risulta per la popolazione dell'Etna pari a 0,096, invece quello più alto è per la popolazione norvegese di Stavanger con  $F_{is}=0,445$ . Gli altri comprensori presentano un  $F_{is}$  che si avvicina alla media di 0,304 (Tabella B2). Altra fonte di diversità è il raggruppamento per popolazioni ecogeografiche, alle quali si associa il concetto di bosco, che può essere usato anche come sinonimo. A questo livello, per i popolamenti di Monticchio-Vulture (1), Monte Vettrice (7), Pietra Iaccata Nord (23) ed Etna (36) si osserva un basso  $F_{is}$  pari rispettivamente a 0,074, 0,026, 0,042 e 0,096. Coefficienti di inbreeding ( $F_{is}$ ) alti di 0,437 e 0,445 appartengono alla Foresta Umbra (37) e al Nord Europa (38) rispettivamente.

Gli altri boschi si approssimano alla media di 0,261, media che si abbassa a 0,209 escludendo il marcatore FS4-46 nelle analisi statistiche (Tabella C). Questo marcatore è stato escluso a posteriori per la presenza di una percentuale osservata di alleli nulli-formi maggiore del 20%, in ac-

cordo con quanto descritto in letteratura (Pastorelli et al. 2003). La non fissazione di questi alleli, legata a cicli di riproduzione molto lunghi in generale per le specie forestali e nel particolare per il faggio, può comportare una sotto-stima della diversità genetica (Scotti et al., 1999), in quanto i nulli-formi sono considerati alla pari degli omozigoti dai softwares di analisi genetiche. Nei boschi in cui è stato possibile raccogliere individui appartenenti alla generazione filiale (inferiore ai 25 anni di età), i parametri che caratterizzano la struttura genetica sono stati stimati tra generazione parentale e filiale all'interno della popolazione eco-geografica di appartenenza. In linea di massima, le generazioni filiali mostrano  $F_{is}$  maggiori rispetto a quelli delle rispettive generazioni parentali.

In otto boschi non si osserva differenziazione genetica ( $F_{st} = 0$ ) tra parentali e figli, mentre nei rimanenti boschi è molto piccola, tendente a zero. Un risultato discostante da tutti gli altri è quello della faggeta di Moliterno, dove la differenziazione significativa ( $F_{st}$ ) tra madri e figli è massima (0,136), con un  $F_{is}$  di 0,08 per i figli e di 0,297 per le madri (Tabella D). La seconda sorgente di differenziazione presa in considerazione in questo lavoro è la categoria fisionomica.

La categoria fisionomica per definizione è l'aspetto che un bosco assume in rapporto alle specie arboree che lo edificano. La categoria con conifere e latifoglie presenta un  $F_{is}$  di 0,481, che risulta massimo.

Tutti gli altri valori si avvicinano alla media di 0,280, con l'assenza di valori prossimi allo zero (Tabella E). L'ultima fonte di variabilità è stata l'altitudine suddivisa in tre classi: fino a 1000 metri, tra 1000 e 1500 metri e oltre i 1500 metri s.l.m. La media dell'indice di fissazione è di 0,295, mentre l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) ed osservata ( $H_o$ ) delle 3 classi di altitudine si approssimano di molto alle rispettive medie di 81,3% e 57,4% (Tabella F). L'assenza di un chiaro trend tra questi 3 livelli di altitudine, consente di ipotizzare che le tre classi coincidano, secondo un profilo verticale di distribuzione della diversità genetica proposto dallo schema  $L=M=H$  del modello di Ohsawa e Ide (2007), dove L, M e H stanno rispettivamente per popolazioni a bassa, intermedia e alta quota (sezione 1.3). Questo profilo non rientra nei tre casi ipotizzati dal modello, bensì nel quarto caso, nel quale un ampio ed intenso flusso genico ( $Nm$ ) tende ad omogeneizzare le popolazioni tra loro. Nello studio tedesco con isoenzimi di Sander et al. (2000), una popolazione di faggio localizzata tra i

600-660 metri mostra una eterozigosità attesa ( $H_e=0,328$ ) ed un numero di alleli ( $N_e=1,63$ ) significativamente maggiori rispetto agli altri 5 popolamenti collocati tra i 150-600 metri. La differenziazione genetica stimata tra queste 6 popolazioni tedesche risulta di  $G_{st}=0,0091$ .

Nella tabella che sintetizza la differenziazione genetica per marcatori nucleari (Tabella G), il parametro  $F_{st}$  è risultato significativamente maggiore tra le popolazioni eco-geografiche o boschi (0.039) e significativamente minore tra classi di altitudine (0.0034). In un lavoro dove due popolamenti italiani dell'Abruzzo sono stati confrontati con altre 8 popolazioni localizzate in 4 differenti stati europei, per 4 marcatori identici a quelli usati in questa ricerca, hanno mostrato una differenziazione significativa di 0,058 tra le 10 faggete e di 0,0168 tra le due popolazioni italiane, differenziazione misurata sempre dal medesimo parametro di Wright,  $F_{st}$  (Buiteveld et al. 2007). Si è scelto di descrivere l'indice di fissazione ( $F_{is}$ ) perché permette di definire di quanto un popolamento si possa allontanare dalle condizioni di equilibrio, o in altri termini di quanto l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) si avvicini a quella attesa ( $H_e$ ).

Valori bassi di  $F_{is}$  come quelli in precedenza descritti, indicano condizioni prossime all'equilibrio e che l'inbreeding non influisce molto sulle popolazioni caratterizzate da isolamento eco-geografico (Muller-Stark 1996, citato da Wang 2004), mentre valori alti suggeriscono che tale equilibrio possa essere alterato da fattori selettivi di varia natura (antropica e non). Da una prima analisi, si potrebbe affermare che i boschi isolati, meno densi, con un minor numero di individui, all'interno dei quali il polline si diffonde fino ad una distanza di 50 metri ma può immigrare da 500 metri (Wang, 2004), siano in condizioni di equilibrio.

Nei boschi con un maggior numero di individui e con una maggiore densità la diffusione del polline potrebbe essere ostacolata, favorendo un accoppiamento tra individui vicini, determinando un innalzamento dei valori del coefficiente di inbreeding.

Valori alti dell'indice di fissazione ( $F_{is}$ ) sono riscontrati nella categoria fitonomica del bosco di conifere e latifoglie, dove la maggiore presenza in termini percentuali di queste specie potrebbe rappresentare un ostacolo alla diffusione del polline di faggio.

Altri innalzamenti considerevoli si osservano nelle popolazioni più settentrionali ed isolate come nella Foresta Umbra ed in Norvegia, dove di

conseguenza si ha rispettivamente una  $H_o$  del 44,8% e del 35%. Valori in accordo con quelli previsti dai modelli di espansione (aumento numerico di individui) e di contrazione (diminuzione numerica degli individui), secondo cui una più alta diversità intra-specifica è osservata nelle aree meridionali rispetto alle aree del Nord ricolonizzate (Taberlet et al. 1998). Si ricorda che per *Fagus sylvatica* l'Appennino della Basilicata è considerato un rifugio glaciale dove maggiore è la variabilità (Vettori et al. 2004, Magri et al. 2006).

In questo lavoro, la stima della variabilità entro-bosco delle popolazioni eco-geografiche è del 57,7%, misurata dal parametro dell'eterozigosità osservata media. In un altro studio, popolamenti del Centro Europa analizzati con 3 loci microsatelliti nucleari identici a quelli usati qui, mostrano una  $H_o$  che va dal 56% al 72,1%, con un  $F_{is}$  medio di 0,224 (Buiteveld et al. 2007). Una popolazione della Bassa Sassonia (Germania) presenta un  $F_{is}$  di 0,192 con una  $H_o$  del 57,2% (Vornam et al. 2004) per loci microsatelliti differenti (solamente il locus *mfc5* è comune ad entrambe le ricerche). Infine, il flusso genico ( $Nm$ ) è stato valutato tra comprensori e tra boschi (popolazioni eco-geografiche) entro-comprensorio. Al livello di comprensorio è stato scoperto un trend decrescente in direzione Sud-Nord, con un valore massimo inter-scambiato tra Etna e Basilicata Meridionale ( $Nm = 25,11$ ) ed uno minimo ( $Nm = 3,48$ ) tra Foresta Umbra e Nord Europa (Tabella H). La probabilità di uno scambio di polline tra il Gargano e la popolazione norvegese di Stavanger è molto bassa per l'enorme distanza geografica che separa le due aree; ma ciò potrebbe suggerire un ulteriore e leggero andamento decrescente in direzione Sud-Nord, come mostrato in tabella. Un lento trend decrescente potrebbe essere ipotizzabile dalla Sicilia alla Basilicata attraverso i popolamenti dell'Appennino Calabro, e dal Gargano al nord Italia attraverso l'Appennino centrale. Per quanto concerne il flusso genico,  $Nm$  è una misura utile nel prevenire la divergenza delle popolazioni attraverso il "drift" genetico (Slatkin, 1987). Il drift genetico, noto anche come deriva genetica, consiste in un fenomeno casuale di cambiamento delle frequenze alleliche ("effetto collo di bottiglia", "effetto fondatore"), correlato al numero di individui che costituiscono una popolazione. In generale, quando la grandezza della popolazione è piccola la deriva genetica sarà più forte. In una popolazione molto piccola, poche generazioni potrebbero far scomparire comple-

tamente un allele [ $f(p)=0$ ], oppure farlo fissare completamente [ $f(q)=1$ ] (Ayala 1987). Il genetic drift può determinare una sostanziale differenziazione se  $Nm$  è minore di 1, ma non se  $Nm$  è maggiore di 1 (Slatkin, 1987). Tra i comprensori studiati in questo lavoro tutti i valori  $Nm$  sono maggiori di 1. Il metodo indiretto di stima di  $Nm$  sostiene che a piccole differenziazioni tra popolamenti ( $F_{st}$ ) corrispondono ampi flussi genici che intercorrono tra le medesime. Questi estesi flussi tendono ad omogeneizzare le popolazioni tra loro. Poiché questo metodo di misura del flusso genico ( $Nm$ ) si basa sulla stima della differenziazione genetica ( $F_{st}$ ), definita anche come la probabilità che due alleli osservati in popolazioni differenti siano identici per discendenza da una popolazione ancestrale in comune (Weir e Cockerham 1984, Weir 1996), permette di valutare se i boschi localizzati all'interno del rispettivo comprensorio sono tra loro omogenei o differenziati per loci nucleari.

Per la descrizione dei flussi genici tra boschi entro-comprensorio, le rispettive popolazioni dell'Etna, della Foresta Umbra e della Norvegia vengono escluse in quanto rappresentano dei popolamenti isolati ecogeograficamente e non dei veri e propri comprensori sub-regionali, come il parco del Cilento, la Basilicata settentrionale, centrale e meridionale. In quest'ultimo comprensorio, è possibile definire *a-posteriori* una popolazione geneticamente omogenea per i loci nucleari, costituita dai boschi 26, 29 (Mappa H), 30 e 32 (Mappa I), con flussi stimati di  $Nm=32,84$  e di 19,51, rispettivamente tra il Monte Raparo (26) ed il Monte Alpi (29) e, tra il M. La Spina (30) ed il M. del Pollino (32).

La faggeta del M. Sirino pur essendo omogenea con gli altri popolamenti del comprensorio meridionale sotto il profilo cloroplastico, mostra flussi genici sostanzialmente più bassi per i loci nucleari ( $Nm=2,52$ , 1,98, Mappa H), differenziandosi quindi dalle altre faggete (26, 29, 30, 32). La faggeta di Moliterno (Mappa H), presentando valori di  $Nm$  uguali a 18,6 e 42,4, rispettivamente inter-scambiati con il Monte Madonna di Viaggiano (20) e Calvelluzzo (15), è geneticamente simile alle popolazioni del comprensorio della Basilicata centrale.

I popolamenti della Basilicata centrale per la presenza di elevati flussi genici (ad es.  $Nm=146$  tra le faggete 16 e 22, Mappa G), possono essere considerati un'unica popolazione geneticamente omogenea.

Per valori di flusso genico ( $Nm$ ) compresi tra 3 e 5, i Monti della Madda-

lena (11) risultano differenziati dalle faggete del comprensorio centrale (Mappa G), ma geneticamente simili ( $N_m=18,24$ ,  $N_m=13,84$ ) alle subpopolazioni del parco del Cilento (Mappa L, Mappa M), le quali a loro volta possono costituire un'unica popolazione che, differenziandosi dai popolamenti della Basilicata meridionale e centrale, risulta connessa con la Basilicata settentrionale attraverso il corridoio ecologico rappresentato dal Monte Paratiello ( $N_m=21,64$  tra Massiccio degli Alburni e Paratiello, Mappa L). Il comprensorio settentrionale può essere ipotizzato come un'altra area geneticamente omogenea per i loci nucleari, strettamente connessa con l'area del Cilento, ma decisamente differenziata dalla Basilicata centrale per i bassi valori di flusso osservati tra il Monte Vetrice e Crocetta e, tra Li Foj e Crocetta. In quest'ultimo caso il flusso genico è uguale a zero e per valori di flusso inferiori ad 1, Slatkin (1987) ipotizza una deriva genetica, ma poiché la faggeta del Monte Li Foj presenta flussi genici maggiori di 1 ( $N_m=5,8$ ), sia con il Bosco San Cataldo che con il Monte Caruso, la forza evolutiva del genetic drift non dovrebbe determinare una sua ulteriore differenziazione. Non è possibile in nessun caso individuare la esatta direzione di diffusione del polline, perché per definizione il flusso è bidirezionale, essendo stimato solamente tra due popolazioni.

Riassumendo, *a-posteriori* si possono ipotizzare 4 aree geneticamente omogenee di *Fagus sylvatica* per i loci nucleari: la Basilicata meridionale, la Basilicata centrale, la Basilicata settentrionale connessa con il parco del Cilento e la Foresta Umbra.

Il metodo indiretto di valutazione del flusso genico fornisce delle stime su lunghi periodi di tempo, che non coincidono con i livelli di flusso attuali, inter-scambiati nel presente (Slatkin 1987). Per conoscere la capacità adattativa e quindi la storia futura di tutti i boschi analizzati, sarebbe necessario continuare lo studio anche con l'analisi della distribuzione ecogeografica della variazione molecolare di alcuni geni candidati che hanno un ruolo chiave nell'adattamento all'ambiente.