

5. ALLEGATI

5.1. Protocolli di isolamento e purificazione del DNA genomico totale

5.1.1. Protocollo *Trans-Prep e Nuc. Prep-Station 6100*

L'estrazione del DNA genomico totale da tessuti vegetali gemme e foglie, è stata ottimizzata in base al protocollo di seguito descritto.

Per completare l'intero processo di estrazione è necessario il kit *Trans-Prep* (Applied Biosystems) composto dalle seguenti soluzioni:

1. DNA Wash Solution 1. Da usarsi con la genomic DNA purification Tray 1;
2. DNA Wash Solution 2. Da usarsi con la genomic DNA purification Tray 2;
3. DNA Elution Solution. Da usarsi con la genomic DNA purification Tray 1;
4. DNA Precipitation 1. Da usarsi con la genomic DNA purification 1;
5. DNA Precipitation 2. Da usarsi con la genomic DNA purification 2;
6. Nucleic acid purification lysis solution;

N.B. Le sostanze vengono versate così come da stock.

Predisporre inoltre di:

- 1) Acqua HPLC grade (Sigma-Aldrich);
- 2) Buffer di lisi 1x in eppendorf da 50 ml, ottenuto miscelando 25ml di buffer 2x e 25 ml di PBS;
- 3) Piastra Genomic DNA Purification 1;
- 4) Splash guards ABI PRISM (Applied Biosystem);
- 5) Micro amp.optical 96-Well Reaction Plate with barcone;
- 6) Bagnetto termostatico.

Fase 1: macerazione

- Pesare 50-150 mg di foglie o di gemme, immergerli in azoto liquido e tritarle con pestello e mortaio o con una macchina trituratrice apposita (TissueLyser, Qiagen).

Potrebbe essere necessaria la ripetizione di questa operazione più volte, fin, quando il materiale non risulti essere ben macerato.

Per quanto concerne le gemme, è preferibile macinarle con pestello e

mortaio, perché risultano più resistenti all'omogeneizzazione fatta con le sole sfere metalliche della TissueLyser.

Preparare Buffer di lisi 1X, partendo da lysis buffer 2X e PBS in rapporto 1:1 (volume in funzione del numero di campioni ai quali deve essere aggiunto 1-1,5 ml di buffer di lisi 1X).

Con una micro pipetta P1000, aggiungere nelle eppendorf con il materiale sminuzzato, 1,5 ml di buffer preparato;

risospendere su vortex per 15 sec;

- incubare a 100 °C nel bagnetto termostatico per 15 min., vortexando i campioni ogni 3 min.;

- lasciare raffreddare i campioni a temperatura ambiente;

- centrifugare a 13000 rpm per 6min. a temperatura ambiente;

- recuperare il surnatante (circa 200-600 µl) inserendolo in una nuova eppendorf da 2 ml ed aggiungere 100 ul della Soluzione di Precipitazione 1 e 300 ul della Soluzione di Precipitazione 2, ottenendo un rapporto di 1 a 2 tra surnatante e soluzioni. Miscelare le provette agitandole con le mani.

Dopo aver recuperato tutto il surnatante, buttare via le provette contenenti i tessuti vegetali.

N.B: Conservare le provette contenenti questa ultima mix che, andranno utilizzate nel caso di una seconda estrazione.

Fase 2: Estrazione

Accendere l'estrattore ABI PRISM 6100 Nucleic-Acid prep Station, che purifica gli acidi nucleici presenti nella soluzione acquosa che costituisce il surnatante ottenuto così come descritto dall'ultimo punto della fase 1. La macchina consente il trattenimento dei soli acidi nucleici grazie all'uso di 2 piastre con 96 pozzetti dotati di filtri per il setacciamento di biomolecole, le quali piastre vanno poste in due differenti posizioni ("waste" e "collection") della work station.

La work station segue il protocollo seguente:

- nella posizione *waste* (posizione raccolta rifiuti) collocare la *Splash guards*, mentre nella posizione *collection* (posizione per la raccolta del DNA estratto) installare la *96 Well-Optical-Reaction Plate*; successivamente posizionare la *Genomic-Purification Tray 1* sul carrello;

- accendere lo strumento;

- collocare il Carrello in posizione *Waste* ed inumidire i pozzetti della *Ge-*

Genomic Purification Tray 1 con 40 ul di *Wash Solution 1*, e cliccare *Quick*; selezionare *Method* sul keyboard;

- scegliere il protocollo *Trans-Prep*; (TRansPrep., 2002).

Fase 3: Utilizzo dello strumento

In funzione del volume dei residui organici, recuperare un volume variabile di campione (200-600 ul) dalle provette con il surnatante omogeneizzato con le soluzioni di precipitazione 1 e 2, e introdurlo nei pozzetti della *Genomic Purification Tray 1*.

- Applicare 120 sec. di vuoto del 20% (Start Step 1);

- aggiungere per ogni pozzetto 600 ul della Soluzione di Lavaggio 1. (secondo un rapporto di surnatante-soluzione di 1:3). Applicare 90 sec. di vuoto del 20% (Start Step 2) sul display;

- aggiungere per ogni pozzetto 600 ul della Soluzione di Lavaggio 2. (in rapporto surnatante-soluzione 1:3). Applicare 90 sec di vuoto del 20% (Start Step 3) sul display;

- applicare 30 sec di vuoto del 30% (Start Step 4) sul display;

- sollevare il carrello e agitarlo manualmente con movimento alternato per consentire il completo svuotamento dei pozzetti. *Touch off* (Start Step 5) sul display;

N.B.: accertarsi che al termine di ogni passaggio i pozzetti della Genomic-Purification Tray 1 siano perfettamente vuoti, in caso contrario ripetere l'operazione.

- Collocare il carrello in posizione *Collection*;

- aggiungere 80 ul della Soluzione di Eluzione. Incubare a T.A. per 2 min. (Start Step 6) sul display;

- touch off (Start Step 8);

- recuperare il DNA così ottenuto dalla piastra *Optical 96-Well Reaction Plate* con una pipetta P100 e versarlo in provette *eppendorf* da 1,5 ml;

- conservare il DNA ottenuto a -20 °C per evitare fenomeni di degradazione (Sambrook *et al.*,1989).

N.B: è possibile effettuare una seconda estrazione partendo dall'ultimo punto della fase 1, dalla mix dei 200 µl di surnatante del processo di macerazione con i 100 µl di soluzione di precipitazione 1 e i 300 µl di soluzione di precipitazione 2.

5.1.2. Protocollo DNeasy Plant Mini kit (Qiagen)

Dopo la macerazione di 50-150 mg di tessuti vegetali, gemme o foglie, con il Tissue Lyser (Qiagen) o con pestello e mortaio, per completare l'intero processo di estrazione è necessario il kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) composto dai seguenti materiali:

- buffers AP1, AP2, AP3/E, AW, AE, RNase (100 mg/ml), etanolo al 95% e due tipi di colonnine (bianca, lilla) dotate di specifici filtri per il trattenimento del DNA genomico totale.

Prima di usare le soluzioni accertarsi che non si siano formati dei precipitati, in caso affermativo dissolverli con riscaldamento in bagnetto termostatico a 65 °C.

a) Aggiungere 400 ul di buffer AP1 e 4 ul di RNase (100 mg/ml) ai 50-150 mg di tessuti vegetali macerati. Vortex.

b) Incubare per 10 minuti a 65 °C nel bagnetto termostatico. Miscelare i campioni ogni 2-3 minuti, agitando le provette con le mani.

c) Aggiungere 130 ul di buffer AP2 al lisato e mantenere la mix su ghiaccio per 5 minuti.

d) Centrifugare la miscela a 13000 rpm per 6 minuti. Tutte le centrifughe devono essere eseguite a temperatura ambiente (15-25 °C).

e) Dalla precedente centrifugazione (d) buttare via il residuo solido e prelevare la quantità massima di frazione liquida dal lisato, e pipettarlo nella colonnina color lilla. Centrifugare a 13000 rpm per 3 minuti.

f) Trasferire la frazione liquida ottenuta dalla precedente centrifugazione (e) in una eppendorf da 2 ml prestando attenzione a non toccare il pellet.

g) Aggiungere AP3/E (in rapporto 1/1.5 di volume) al lisato privato di pellet, ottenuto al passaggio (f); miscelare pipettando.

h) Prelevare 650 ul di soluzione ottenuta al passaggio (g) e versarla nella colonnina di colore bianco collocata in una provetta di 2 ml. Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto ed eliminare la fase liquida dalla provetta di 2 ml.

i) Ripetere il passaggio (h) con la rimanente soluzione ottenuta nel passaggio (g).

l) Collocare la colonnina bianca in una nuova provetta da 2 ml. Aggiungere 500 ul di buffer AW alla colonnina bianca e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto. Eliminare la fase liquida dalla provetta di 2 ml e riutilizzar-

la al punto (m).

m) Aggiungere nuovamente 500 ul di buffer AW alla colonnina bianca e centrifugare a 13000 rpm per 3 minuti, affinché la membrana della colonnina si asciughi.

n) Trasferire la colonnina bianca in una nuova eppendorf e aggiungere 100 ul di buffer AE. Aspettare 5 minuti a temperatura ambiente (15-25 °C) prima di centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto. Il filtrato ottenuto nella eppendorf sarà il DNA genomico totale.

Infine, per quanto riguarda la natura di tutte le soluzioni impiegate per l'estrazione e purificazione del DNA, bisogna far riferimento alle schede di sicurezza che accompagnano i kits di entrambi i metodi usati.

5.2. Mappe e tabelle

5.2.1. *Area Investigata*



Mappa A

Areale geografico oggetto dello studio con i due controlli rispettivamente a Nord (Norvegia) e a Sud (Etna).

5.2.2. *Microsatelliti*

Locus	Sequenza Primers 5'3'	Anneal. Temp. (°C)	Intervallo pesi molecolari (bp)	N° Alleli	Bibliografia
FS4-46	GCAGTCTCCAGCATTACTA. TACAACAGCAGGCTATCCAT	60	197-400	13	Pastorelli R. 2003
FS1-03	Ned-CACAGCTTGACAGATTCCAAAC (GTGTCTT)TGATAAAGCAGTTTTGCCACT	60	96-136	21	Pastorelli R. 2003
FS1-15	Vic-TCAAAGCCAGTAAATTTCTCA (GTGTCTT)GGCTCAATGAAGTCAAAAAC	60	107-139	17	Pastorelli R. 2003
FS3-04	oFam-AGATGCAGCACTTCAAATTC (GTGTCTT)TCTCTCAGCAACATACTC	60	209-220	5	Pastorelli R. 2003
MFC5	oFam-ACTGGCAGAAAAAAGAAAA (GTGTCTT) GAAGGACCAAGGCACATAAA	60	281-336	30	Tanaka K. 1999
Cmcs3	oFam-AGAGTAAGGTTTTATTAGTATAGA (GTGTCTT)CTGGATAATTTGTTCGAT	52	181-182-183	3	Sebastiani F. 2004
Cmcs12	Vic-ATATTGGTAAACCGCAACT (GTGTCTT)TTTATGGCATGAAACAACCTC	52	246-247-248	3	Sebastiani F. 2004

Tabella A

Loci microsatelliti analizzati. Da sinistra verso destra è riportato il nome, la sequenza dei primers, le caratteristiche di reazione, chimiche e bibliografiche (sezioni 2.2.2 e 2.2.3). In questa tabella sono indicati i 5 loci microsatelliti nucleari (FS4-46, FS1-03, FS1-15, FS3-04, MFC5; quest'ultimo in letteratura è riportato anche come FCM5) e i 2 loci cloroplastici (Cmcs3, Cmcs12).

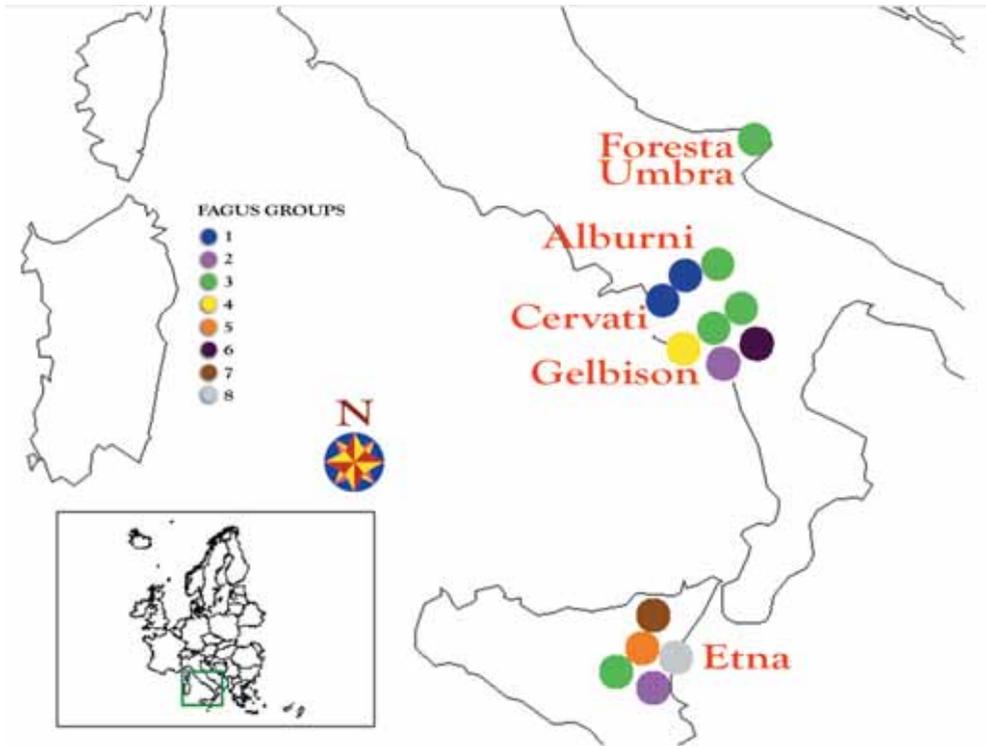
5.2.3. *Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici nelle popolazioni della Norvegia*



Mappa B

Il sotto-gruppo genetico indicato dal cerchio 3-verde è presente nel campione norvegese (sezione 3.1.1.). La frequenza relativa di questo aplotipo è indicata nella tabella B1.

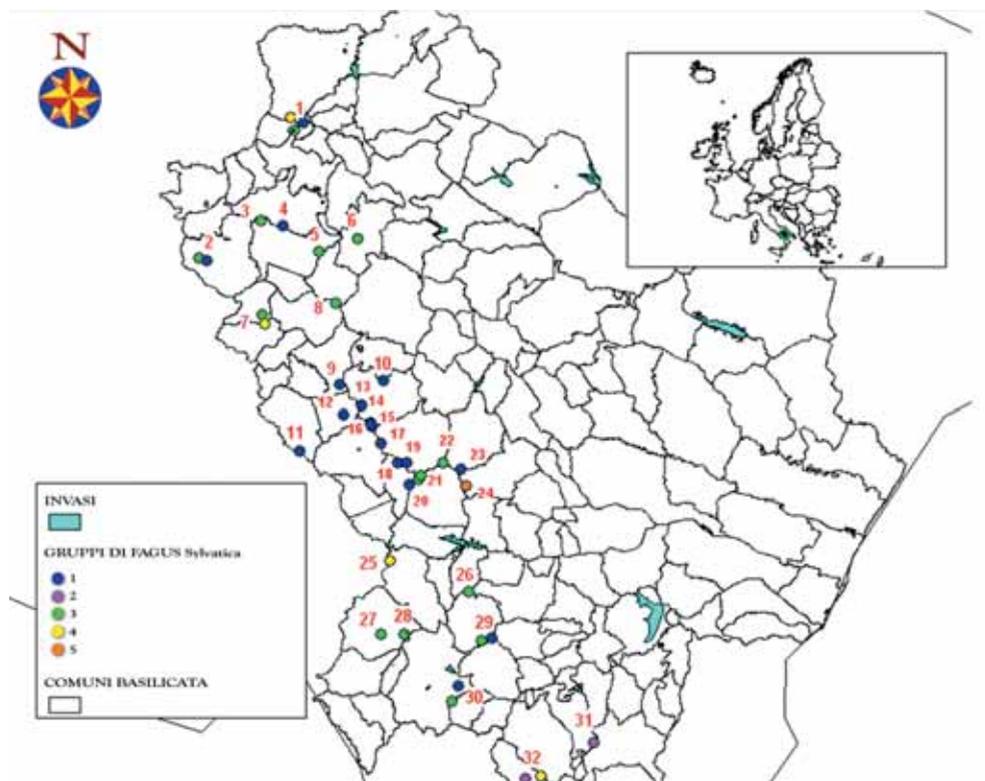
5.2.4. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici nelle popolazioni dell'Etna, del Cilento e del Gargano



Mappa C

I cerchi di diverso colore associati ognuno ad un numero naturale crescente (vedi legenda) rappresentano gli aplotipi identificati nell'aree indicate (sezione 3.1.1.).

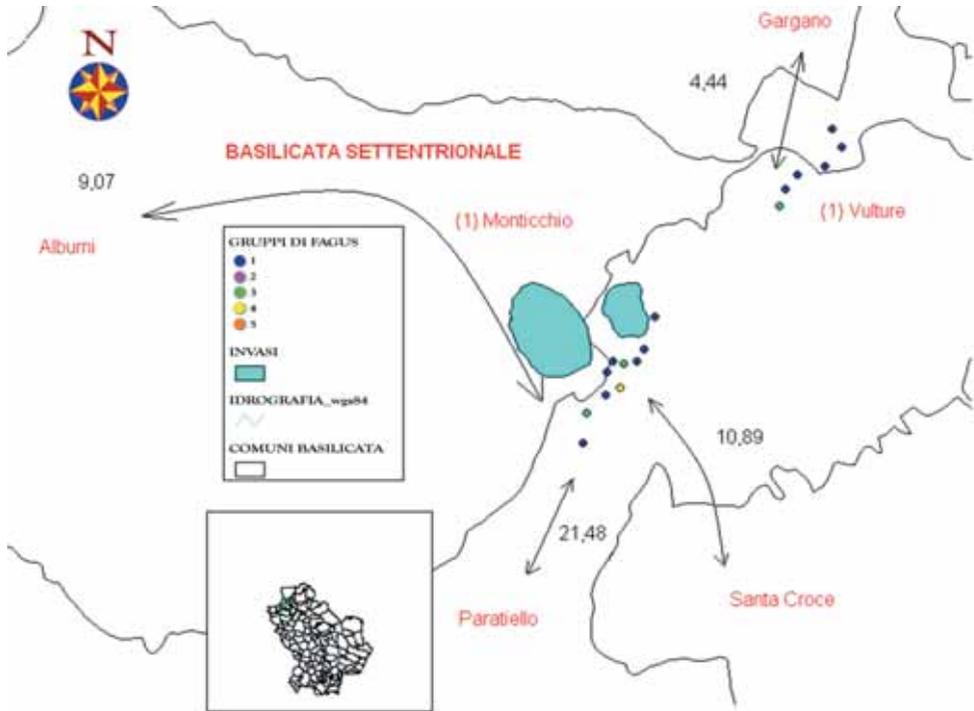
5.2.5. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici nelle popolazioni della Basilicata



Mappa D

I cerchi di diverso colore associati ognuno ad un numero naturale crescente (vedi legenda) rappresentano gli aplotipi identificati nell'Appennino lucano (sezione 3.1.1.). I numeri in rosso, adiacenti a ciascun cerchietto, indicano la popolazione geografica o bosco (Tabella C) in cui sono identificati i rispettivi aplotipi.

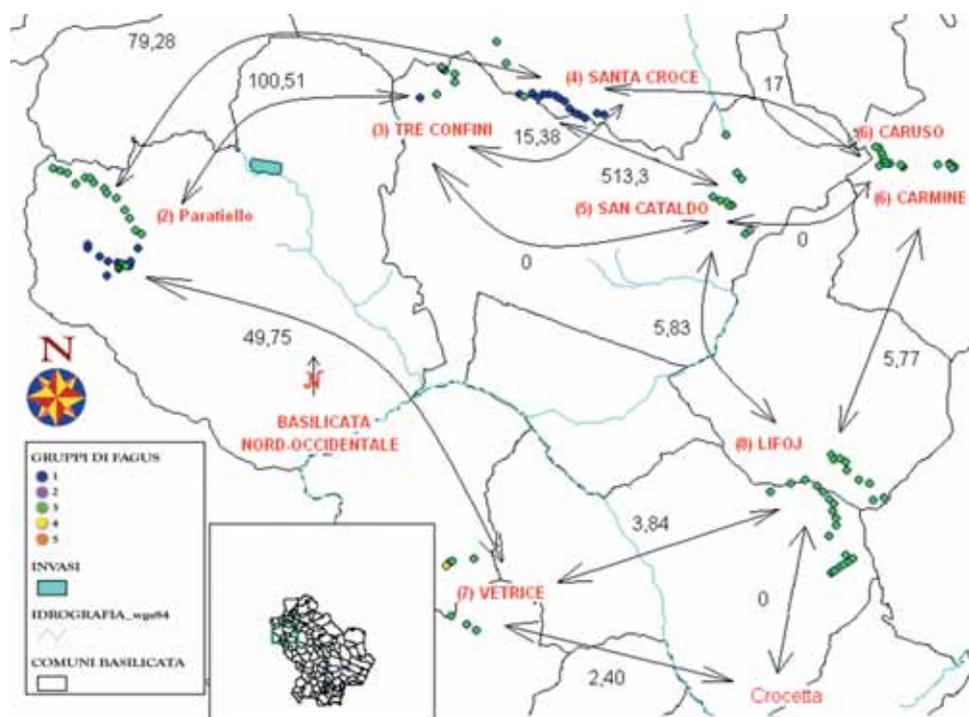
5.2.6. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nella Basilicata Settentrionale



Mappa E

Ogni cerchio rappresenta un singolo aplotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (Nm), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

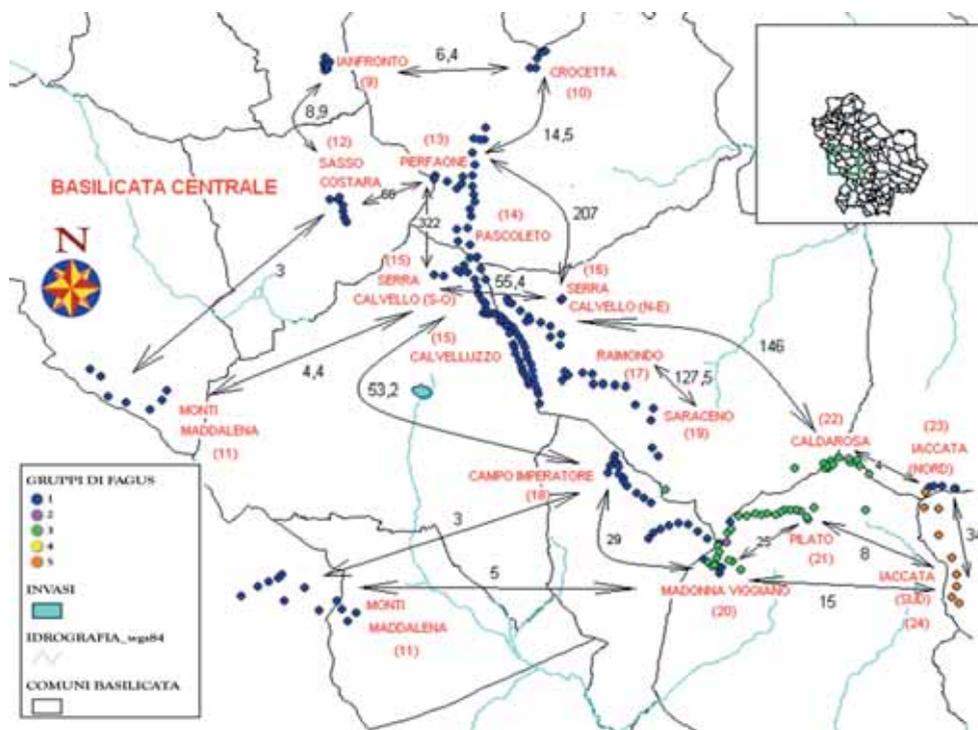
5.2.7. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nella Basilicata Nord-Occidentale



Mappa F

Ogni cerchio rappresenta un singolo aptotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (N_m), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

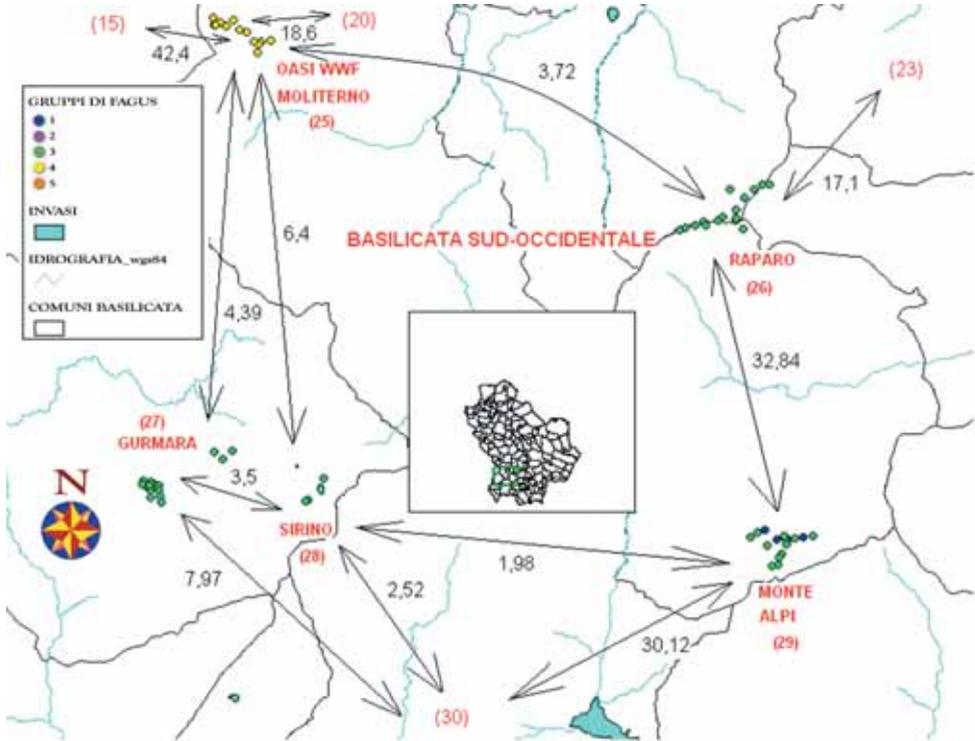
5.2.8. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nella Basilicata Centrale



Mappa G

Ogni cerchio rappresenta un singolo applotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (N_m), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

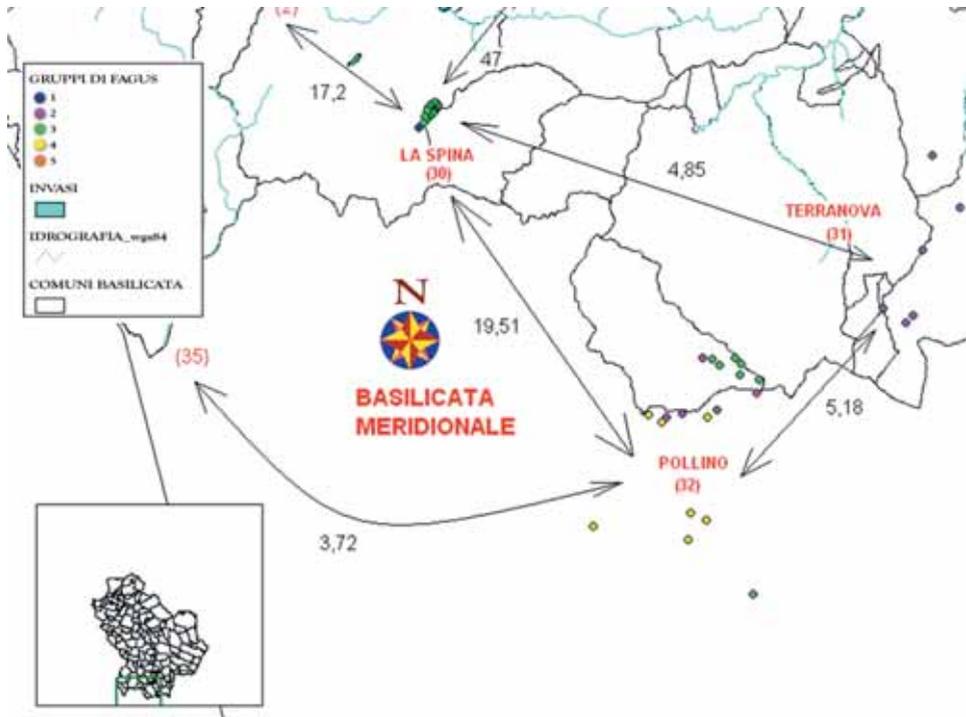
5.2.9. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nella Basilicata Sud-Occidentale



Mappa H

Ogni cerchio rappresenta un singolo aplotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (N_m), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

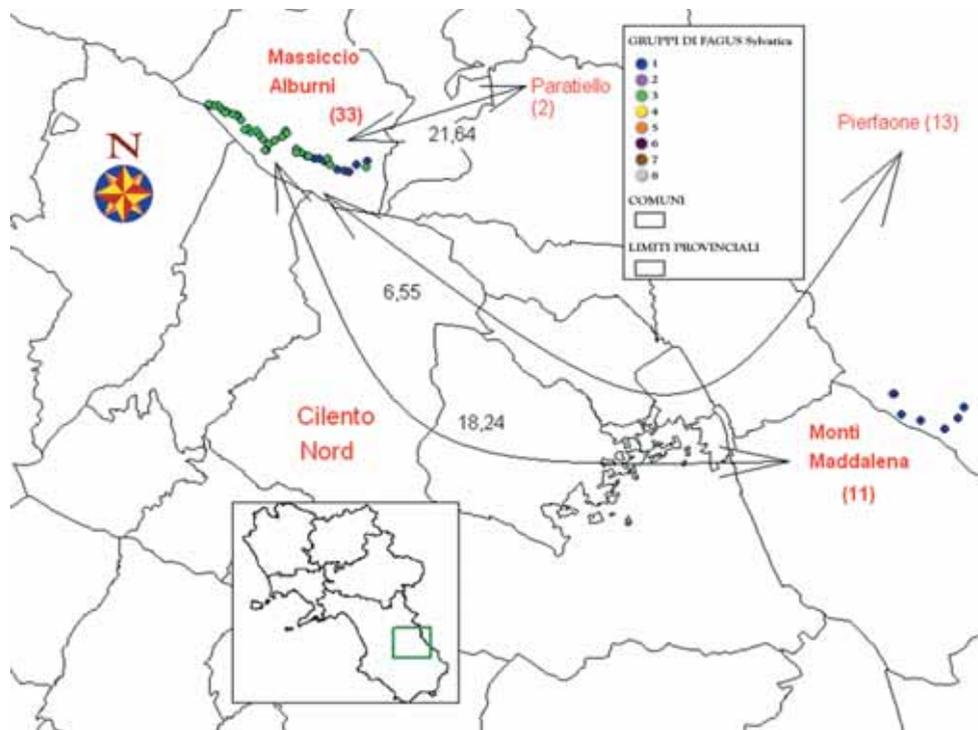
5.2.10. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nella Basilicata Meridionale



Mappa I

Ogni cerchio rappresenta un singolo aplotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (Nm), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

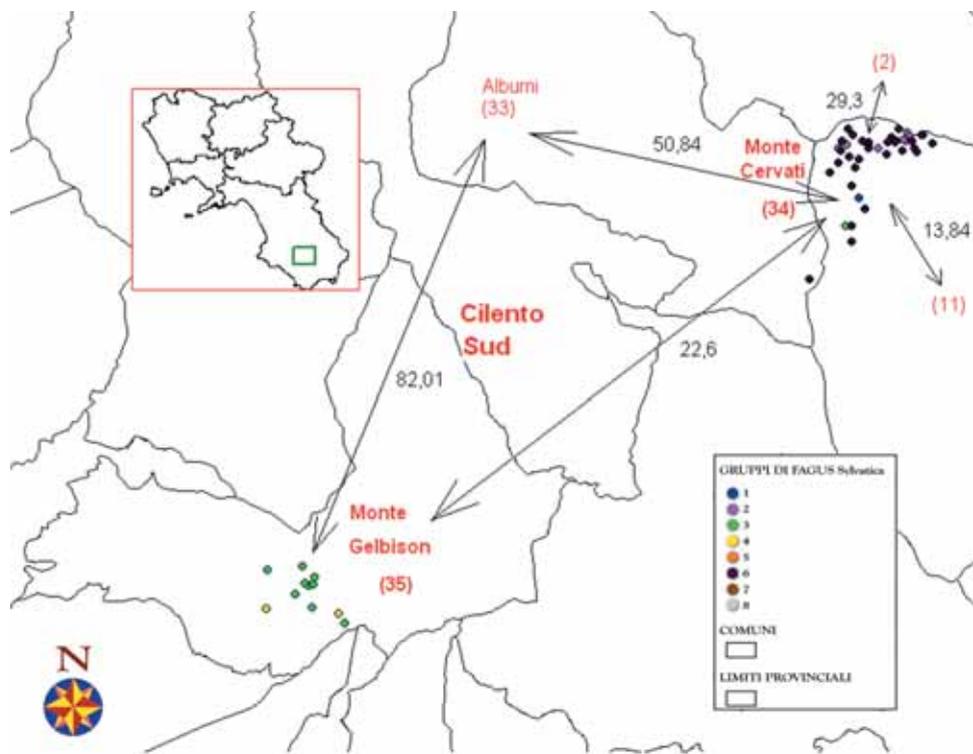
5.2.11. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nel Nord del Parco Nazionale del Cilento



Mappa L

Ogni cerchio rappresenta un singolo aplotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (Nm), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

5.2.12. Distribuzione geografica dei gruppi cloroplastici e dei flussi genici nel Sud del Parco Nazionale del Cilento



Mappa M

Ogni cerchio rappresenta un singolo aplotipo cloroplastico (sezione 3.1.1.). Le sottopopolazioni sono descritte dal nome e dal numero di individui analizzati (Tabella C). Il flusso genico (Nm), espresso come numero di individui scambiato tra due popolazioni per generazione, è rappresentato dal numero adiacente a ciascuna linea di interconnessione tra sottopopolazioni (sezione 3.2.1.).

5.2.12.a. Frequenze aplotipi

Aplotipo	Binomio	Frequenza
CmCs3_181-CmCs12_248	1-blu	0,421
CmCs3_181-CmCs12_246	2-fuksia	0,062
CmCs3_181-CmCs12_247	3-verde	0,415
CmCs3_182-CmCs12_247	4-giallo	0,045
CmCs3_183-CmCs12_247	5-arancione	0,016
CmCs3_182-CmCs12_248	6-nero	0,037
CmCs3_183-CmCs12_246	7-marrone	0,002
CmCs3_183-CmCs12_248	8-grigio	0,002
Totale		1

Tabella B1

Frequenza degli aplotipi nell'intera area di studio.

5.2.12.b. Comprensori sub-regionali

Comprensori	N° individui	He	Ho	Fis	A	N° Alleli Totali
Basilicata Settentrionale	167	0,816	0,624	0,236	14,8	74
Basilicata Centrale	433	0,808	0,576	0,287	15,8	79
Basilicata Meridionale	132	0,803	0,546	0,321	13,6	68
Cilento (SA)	111	0,790	0,551	0,303	13	65
Etna (CT)	11	0,747	0,675	0,096	5,4	27
Foresta Umbra (FG)	21	0,795	0,448	0,437	8,4	42
Nord Europa (Stavanger)	12	0,631	0,350	0,445	4,4	22
Media	126,7	0,770	0,538	0,304	10,7	53,9

Tabella B₂

Eterozigosità attesa (He), eterozigosità osservata (Ho), indice di fissazione o coefficiente di inbreeding (Fis), numero di alleli (A) e numero di alleli totali sono stimati per comprensori (sezione 2.3. e 3.2.1.).

5.2.13. Popolazioni eco-geografiche o boschi

Codice	Popolazioni eco-geografiche	Longitudine	Latitudine	N° individui	He	Ho	Fis	Fis No F+46	A	N° Alleli Totali	N° Cluster
Comprensorio Basilicata Settentrionale											
1	Laghi Monticchio, Monte Vulture (Atella, Rionero in Vulture, PZ)	553369	4532915	16	0,727	0,675	0,074	0,080	7,8	39	3
2	Monte Paratiello (Muro Lucano, PZ)	535133	4509306	47	0,806	0,634	0,214	0,152	10,4	52	2
3	Bosco Tre Contini (Bella, PZ)	545923	4515874	10	0,793	0,580	0,268	0,292	6,8	34	2
4	Monte Santa Croce (San Fele, PZ)	549758	4514923	15	0,793	0,600	0,243	0,251	7,8	39	2
5	Bosco San Cataldo (Bella, PZ)	555945	4510398	10	0,800	0,660	0,175	0,149	7,2	36	1
6	Monte Carmine+Caruso (Avigliano, PZ)	562752	4512759	17	0,784	0,588	0,250	0,229	8	40	1
7	Monte Vetrice (Balvano, PZ)	546077	4499414	8	0,770	0,750	0,026	-0,049	6	30	2
8	Monte Li Foj (Picerno, Ruoti, PZ)	558900	4501436	44	0,806	0,591	0,267	0,179	10,8	54	1
Comprensorio Basilicata Centrale											
9	Bosco Ianfronto (Tiro, PZ)	559622	4487408	10	0,783	0,620	0,208	0,242	6,2	31	1
10	Crocetta (Abriola, PZ)	567178	4488049	8	0,765	0,525	0,314	0,277	6,2	31	1
11	Monti Maddalena (Brienza, Paterno, PZ)	552640	4475775	24	0,791	0,483	0,389	0,341	8,4	42	1
12	Sasso Costara (Sasso, PZ)	560365	4482100	12	0,756	0,617	0,184	0,043	7,4	37	1
13	Monte Pierfaone (Abriola, PZ)	563486	4483734	48	0,788	0,567	0,280	0,224	11	55	1
14	Bosco Pascoletto (Marsico Nuovo, PZ)	564949	4480868	17	0,774	0,576	0,255	0,209	7,6	38	1
15	Serra Calvelloversante Nord-Est- (Calvello, PZ)	565070	4480458	30	0,807	0,527	0,348	0,324	10	50	1
16	Bosco Raimondo (Calvello, PZ)	565252	4480075	18	0,803	0,700	0,128	0,052	9,6	48	1
17	Serra Calvello-Sud-Ovest, Calvelluzzo (Marsico N., Calvello, PZ)	566846	4477092	68	0,786	0,588	0,252	0,169	12,2	61	1
18	Campo Imperatore (Marsico Vetere, PZ)	569767	4473920	26	0,776	0,600	0,227	0,161	9,8	49	1
Comprensorio Basilicata Meridionale											
19	Monte Saraceno (Calvello, PZ)	571303	4473879	10	0,756	0,620	0,180	0,124	6,2	31	1
20	Monte Madonna Viggiano, (Marsico V., Viggiano, PZ)	573420	4470838	41	0,821	0,556	0,322	0,278	11,2	56	2
21	Monte Pilato Viggiano, (PZ)	573837	4471590	29	0,802	0,538	0,329	0,286	9,4	47	3
22	Caldarosa (Viggiano, PZ)	577636	4473860	32	0,813	0,588	0,277	0,208	10,8	54	1
23	Pietra Iaccata Nord (Laurianova, PZ)	580675	4472640	7	0,776	0,743	0,042	-0,014	6,4	32	1
24	Pietra Iaccata Sud (Corleto Perticara, PZ)	581737	4469750	8	0,732	0,550	0,248	0,138	5,4	27	2
Comprensorio Basilicata Meridionale											
25	Faggeta Oasi Moliterno (Moliterno, PZ)	568452	4456745	27	0,757	0,556	0,266	0,217	8,8	44	2
26	Monte Raparo (Spinoso, PZ)	582120	4451433	18	0,767	0,567	0,261	0,252	8,2	41	1
27	Monte Gurmara (Lagonegro, PZ)	566724	4443966	19	0,762	0,589	0,227	0,185	8,4	42	2
28	Monte Sirino (Lagonegro, PZ)	570948	4443843	11	0,697	0,509	0,270	0,273	4,8	24	1
29	Monte Alpi (Castelsaraceno, PZ)	584419	4442888	17	0,744	0,462	0,379	0,377	6,2	31	2
30	Monte La Spina (Lauria, PZ)	579229	4432173	23	0,794	0,470	0,408	0,413	8	40	2
31	Terranova del Pollino (Terranova di Pollino, PZ)	604020	4424951	30	0,788	0,673	0,146	0,157	9,8	49	1
32	Pollino (PZ, Cosenza)	594712	4419152	33	0,775	0,527	0,320	0,238	9,4	47	3
Comprensorio Cilento											
33	Massiccio Alburni (Petina, SA)	531985	4484740	47	0,782	0,536	0,314	0,255	11,4	57	2
34	Monte Cervati (Sant'Anna, SA)	539926	4460158	46	0,782	0,574	0,266	0,189	11,4	57	4
35	Monte Celibison (Novi Velia, SA)	528682	4451663	18	0,801	0,533	0,334	0,238	8,8	44	2
Popolazioni di confronto											
36	Etna (CT)	491448	4184518	11	0,747	0,675	0,096	0,117	5,4	27	5
37	Foresta Umbra (FG)	582423	4630674	21	0,795	0,448	0,437	0,365	8,4	42	1
38	Nord Europa (Norvegia, Stavanger)	615384	4515303	12	0,631	0,350	0,445	0,257	4,4	22	1
Media				23,3	0,774	0,577	0,261	0,209	8,3	41,6	

Tabella C

Localizzazione geografica, dimensione del campione ed indicatori genetici stimati per ciascuna sotto popolazione di *F. sylvatica*.

5.2.14. Confronto generazione filiale vs parentale

Codice	Sotto-Popolazioni M/F	N° individui	A	N° Alleli Totali	Ho	Fis	Fst	Limite inferiore	Limite superiore
Basilicata Settentrionale									
2	Monte Paratiello M	31	9,8	49	0,613	0,239	0,004	-0,013	0,029
	Monte Paratiello F	16	8,4	42	0,675	0,164			
8	Monte Li Foj M	30	9,4	47	0,597	0,264	0		
	Monte Li Foj F	14	8,4	42	0,586	0,28			
Basilicata Centrale									
10	Crocetta M	4	4,2	21	0,5	0,355	0		
	Crocetta F	4	4,4	22	0,55	0,32			
11	Monti Maddalena M	18	7,6	38	0,478	0,409	0		
	Monti Maddalena F	6	4,4	22	0,5	0,345			
13	Monte Pierfaone M	24	9,8	49	0,536	0,321	0,015	-0,002	0,039
	Monte Pierfaone F	24	9,2	46	0,608	0,208			
14	Bosco Pascoletto M	9	6,8	34	0,644	0,218	0,026	0,006	0,046
	Bosco Pascoletto F	8	5,2	26	0,50	0,293			
15	Serra Calvello Nord-Est M	15	7,8	39	0,485	0,398	0		
	Serra Calvello Nord-Est F	15	9	45	0,573	0,296			
16	Bosco Raimondo M	9	7,2	36	0,688	0,156	0,018	-0,014	0,067
	Bosco Raimondo F	9	6,6	33	0,711	0,089			
17	S. Calvello (S-O) Calvelluzzo M	40	11	55	0,625	0,214	0,003	-0,012	0,018
	S. Calvello (S-O) Calvelluzzo F	28	10,4	52	0,536	0,309			
18	Campo Imperatore M	13	7,6	38	0,585	0,239	0,029	-0,009	0,066
	Campo Imperatore F	13	7,4	37	0,615	0,197			
19	Monte Saraceno M	5	4,6	23	0,68	0,117	0		
	Monte Saraceno F	5	4,6	23	0,56	0,268			
20	Monte Madonna Viggiano M	24	9,6	48	0,533	0,356	0		
	Monte Madonna Viggiano F	17	8,4	42	0,588	0,282			
21	Monte Pilato M	18	8,4	42	0,555	0,293	0,07	-0,014	0,218
	Monte Pilato F	11	6,8	34	0,509	0,335			
22	Caldarosa M	16	9,2	46	0,625	0,231	0,027	-0,017	0,081
	Caldarosa F	16	8	40	0,55	0,309			
Basilicata Meridionale									
25	Faggeta Oasi Moliterno M	15	7,4	37	0,533	0,297	0,136	-0,014	0,373
	Faggeta Oasi Moliterno F	12	6,4	32	0,583	0,08			
Popolazione di confronto									
37	Foresta Umbra M	15	7,8	39	0,467	0,431	0,034	-0,007	0,075
	Foresta Umbra F	6	4,2	21	0,4	0,439			
	Media	15,6	7,5	37,3	0,559	0,286	0,019		

Tabella D

Codice riportato nelle mappe, sotto-popolazioni (M sta per generazione parentale ed F sta per progenie) e parametri genetici stimati: numero di alleli (A), numero di alleli totali, eterozigosità osservata (Ho), indice di fissazione o coefficiente di inbreeding (Fis), differenziazione genetica calcolata a coppia (Fst) e i livelli di significatività indicati dal limite inferiore e superiore dell'intervallo di confidenza (sezione 2.3. e 3.2.1.).

5.2.15. *Categorie fisionomiche*

Categorie Fisionomiche	N° individui	A	N° Alleli Totali	He	Ho	Fis
Bosco Conifere	7	5,2	26	0,756	0,571	0,259
Bosco Conifere Latifoglie	16	8,6	43	0,806	0,425	0,481
Faggeta Acero	20	9,6	48	0,824	0,650	0,215
Faggeta Arbusteti	12	8,2	41	0,786	0,600	0,245
Faggeta Montana Termofila	43	12,2	61	0,810	0,589	0,275
Faggeta Latifoglie Mesotermofila	33	10,8	54	0,792	0,545	0,315
Faggeta Termofila Mista Cerro	26	10,2	51	0,824	0,649	0,215
Faggio Dominante	486	16,8	84	0,816	0,566	0,307
Faggio Dominante ACGL	35	10,2	51	0,803	0,560	0,306
Misto Cerro Faggio	29	11,6	58	0,813	0,648	0,205
Misto Faggio Abete	17	8,8	44	0,806	0,494	0,394
Misto Faggio Cerro	57	12,4	62	0,807	0,589	0,272
Misto Faggio Cerro Abete Pioppo	12	8,0	40	0,775	0,667	0,146
Media	61	10,2	51	0,801	0,581	0,280

Tabella E.

La categoria fisionomica come fonte di variazione, dimensione delle sub-popolazioni e parametri genetici (sezione 2.3. e 3.2.1.).

5.2.16. *Classi di altitudine*

Popolazioni per Altitudine	N° individui	A	N° Alleli Totali	He	Ho	Fis
1500 metri s.l.m. e oltre	140	15,2	76	0,806	0,573	0,29
Tra 1001 e 1499 metri s.l.m.	603	16,8	84	0,819	0,577	0,295
Fino a 1000 metri s.l.m.	88	13,6	68	0,814	0,57	0,3
Media	277	15,2	76	0,813	0,574	0,295

Tabella F

Fonte di variazione, dimensione della sub-popolazione e parametri genetici (sezione 2.3. e 3.2.1.).

5.2.17. Sintesi differenziazione genetica

Fonte di variazione	Natura dei marcatori	Fst	Limite inferiore	Limite superiore	Numero di repliche	Intervallo di confidenza
Tra popolazioni ecogeografiche	cloroplastica	0,725	0,669	0,75	1000	95%
Tra comprensori	cloroplastica	0,338	0,242	0,417	1000	95%
Tra popolazioni ecogeografiche	nucleare	0,039	0,016	0,065	1000	95%
Tra comprensori	nucleare	0,022	0,012	0,031	1000	95%
Tra categorie fisionomiche	nucleare	0,0083	0,0034	0,0139	1000	95%
Tra popolazioni per altitudine	nucleare	0,0034	0,0006	0,0064	1000	95%

Tabella G

Tutte le fonti di variazione considerate, natura dei marcatori molecolari, differenziazione genetica (Fst), intervallo di confidenza con il limite inferiore, superiore ed il numero di repliche.

5.2.18. Sintesi differenziazione genetica

Flusso genico tra comprensori	Nm
Etna Vs Basilicata Meridionale	25,11
Basilicata Meridionale Vs Basilicata Centrale	14,6
Basilicata Centrale Vs Basilicata Settentrionale	14,4
Basilicata Settentrionale Vs Foresta Umbra	7,44
Foresta Umbra Vs Nord Europa	3,48

Matrice Nm	Nord Europa	Foresta Umbra	Comprensorio Centro	Comprensorio Ovest	Comprensorio Nord	Comprensorio Sud	Etna
Nord Europa	0						
Foresta Umbra	3,48	0					
Comprensorio Centro	3,90	5,74	0				
Comprensorio Ovest	3,93	7,89	9,38	0			
Comprensorio Nord	3,41	7,44	14,40	32,40	0		
Comprensorio Sud	2,91	5,02	14,59	10,58	28,58	0	
Etna	1,92	3,71	5,65	5,07	13,31	25,11	0

Tabella F

Fonte di variazione, dimensione della sub-popolazione e parametri genetici (sezione 2.3. e 3.2.1.).