



REGIONE PUGLIA

**STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA
POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA
DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI
NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI
ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO**

**GRUPPO DI LAVORO:
CHIARA MATTIA, LUCIANA ZOLLO, ENRICO DI TOMMASO
GIUSEPPE LOGLISCI, CLAUDIA MATTIONI, FILIPPO MORETTI**

LAVORO REALIZZATO CON IL CONTRIBUTO FINANZIARIO DELLA REGIONE PUGLIA



REGIONE PUGLIA

**STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA
POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA
DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI
NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI
ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO**

RELAZIONE FINALE

GRUPPO DI LAVORO:

***CHIARA MATTIA**

***LUCIANA ZOLLO**

°ENRICO DI TOMMASO

°GIUSEPPE LOGLISCI

#CLAUDIA MATTIONI

^FILIPPO MORETTI

***FUNZIONARIO DELL'ENTE PARCO NAZIONALE DELL'ALTA MURGIA**

°COLLABORATORE AMMINISTRATIVO DELL'ENTE PARCO NAZIONALE DELL'ALTA MURGIA

#RICERCATORE IBAF

^DOTTORE FORESTALE

LAVORO REALIZZATO CON IL CONTRIBUTO FINANZIARIO DELLA REGIONE PUGLIA

STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO

Premessa.....	2
Estrazione del DNA dai campioni di foglie.....	9
Selezione e Screening dei Primers per il genere Quercus.....	10
Analisi dei dati.....	13
Diversità genetica delle popolazioni.....	13
Struttura delle popolazioni.....	13
Conclusioni dell'analisi genetica.....	18
Analisi dendrometrica.....	20
Verifica dei requisiti per l'inserimento dei popolamenti analizzati nella lista dei boschi da seme. ...	20
Programma di raccolta, riproduzione del materiale di propagazione ed utilizzo del materiale riprodotto da seme in interventi forestali.....	21

ALLEGATI

Cartografie dei siti di rilevamento con stralcio planimetrico IGM, catastale ed ortofotografico	
Schede delle piante censite	

Il presente lavoro è stato realizzato grazie al contributo concesso dal Servizio Foreste dell'Area Politiche per lo Sviluppo Rurale della Regione Puglia a seguito di sottoscrizione di Convenzione finalizzata alla promozione della ricerca scientifica, tecnologica e applicata, riferita al comparto forestale pugliese.

Il lavoro di ricerca è stato coordinato dalla dott.ssa Chiara Mattia funzionario dell'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia.

Le indagini di campo sono state eseguite dalla dott.ssa Chiara Mattia esperta in materie agronomico-forestali e dalla dott.ssa Luciana Zollo naturalista funzionario dell'Ente Parco Nazionale dell'Alta Murgia.

Le analisi genetiche sono state condotte dalla dott.ssa Claudia Mattioni dell'Istituto di Biologia Agroalimentare e Forestale del CNR, di Terni, diretto dal prof. Enrico Brugnoli.

Le analisi auxo-dendrometriche sono state condotte dal dott. Forestale Filippo collaboratore esterno.

Premessa

Sin dal 1966 la Comunità Europea si è preoccupata di emanare tutta una serie di direttive riguardanti il controllo delle caratteristiche genetiche e delle qualità esteriori del materiale di propagazione forestale destinato all'ampliamento delle aree forestali, all'integrazione della rinnovazione naturale e all'arboricoltura da legno. Tale esigenza deriva anche dalle numerose azioni di imboscamento attuate in Italia a partire dal Regio Decreto del 30 dicembre 1923 n. 3267 seguito dal regolamento di attuazione R.D. 1126/1926, finalizzate a contrastare il dissesto idrogeologico, in cui spesso il materiale vegetale utilizzato veniva scelto sulla base dell'elevata capacità di attecchimento in condizioni difficili, non tenendo conto di quella che era la vegetazione potenziale dei luoghi, e confidando in un ritorno naturale di quest'ultima dopo un periodo di attecchimento della vegetazione pioniera e di modificazione delle condizioni edafiche di partenza in favore di una flora più sensibile. Le specie pioniere più usate negli aridi terreni del meridione d'Italia, resi nudi da decenni di disboscamento, furono in prevalenza le conifere che a maturità avrebbero dovuto essere eliminate in favore della vegetazione autoctona ritornata spontaneamente. Tuttavia la gestione dei rimboschimenti di conifere non fu tale da assicurare alle latifoglie autoctone un ritorno adeguato, spesso i popolamenti artificiali non furono opportunamente diradati dando origine a selve fitte di

piante coetanee, spesso in competizione tra loro, che crescevano con grande difficoltà, altamente sensibili agli incendi e con bassissimo livello di biodiversità.

La conservazione della biodiversità genetica negli ecosistemi forestali è un'esigenza scaturita dalla atavica scarsa disponibilità di materiale di propagazione autoctono, che ha determinato il bisogno di conoscere più approfonditamente la flora locale al fine di individuare nuclei di vegetazione originaria da riprodurre ed utilizzare in specifici lavori selvicolturali di miglioramento boschivo e incremento della complessità dei popolamenti presenti.

In tale quadro la Legge n. 269 del 22 maggio 1973 ha riconosciuto per i boschi da seme l'importanza della provenienza del materiale di propagazione e esprimendo il concetto di biodiversità genetica.

Nella Dichiarazione generale della terza conferenza ministeriale sulla protezione delle foreste in Europa svoltasi a Lisbona nel 1998, venne poi stabilito di promuovere le specie arboree indigene e di provenienza locale in quanto maggiormente adatte alle condizioni dei luoghi per l'imboschimento e il rimboschimento dei suoli, infine la Direttiva 1999/105/CE del 22 dicembre 1999 relativa alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione prevede che i materiali di moltiplicazione di specie arboree e ibridi artificiali importanti a fini forestali dovessero essere geneticamente adatti alle varie condizioni locali ed essere di alta qualità; a tal fine la conservazione e la promozione della biodiversità delle foreste, compresa la diversità genetica degli alberi, rappresentò un elemento fondamentale della gestione forestale sostenibile e per la costituzione di riserve di materiale di propagazione di ecotipi locali di specie autoctone.

IL D.lgs. 10 novembre 2003, n. 386 "Attuazione della Direttiva 1999/105/CE", prevede al comma 1 dell'art. 10, che le regioni istituissero un registro dei materiali di base ammessi nel proprio territorio per le specie indicate nell'allegato I del decreto stesso. Con la Deliberazione della Giunta Regione Puglia n. 2461 del 16 dicembre 2008, "Istituzione del registro regionale dei boschi da seme ai sensi del D.Lgs 386/03" è stato istituito il "Registro dei boschi da seme della Regione Puglia" nel quale vengono inseriti i boschi, le aree di raccolta e le singole piante, ritenuti idonei alla produzione di materiale forestale di moltiplicazione e che soddisfano i requisiti minimi previsti dal D. Lgs. 386/2003 per le diverse categorie (identificati alla fonte, selezionati, qualificati e controllati). Attualmente l'elenco dei boschi e popolamenti boschivi da inserire nel registro dei boschi da seme della Regione Puglia approvato con Deliberazione del Dirigente del Servizio Foreste n. 757 del 21/12/2009 comprende 51 siti. Di questi soltanto due, Bosco Scoparella e Foresta Mercadante, ricadono all'interno del Parco nazionale dell'Alta Murgia, e sono individuati quali boschi da seme per due specie appartenenti al genere Quercus la roverella e la coccifera, mentre per il fragno non

STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO

gli unici popolamenti da seme sono individuati nella Valle d'Itria in agro di Martina Franca in provincia di Taranto, luogo in cui quest'ultima specie è endemica.

Infatti il fragno, *Quercus trojana* Webb, quercia semi-decdua, il cui areale di distribuzione è localizzato nell'ambito della Penisola Italiana esclusivamente nella Murgia sud-orientale è presente nei territori boscati dei comuni di Cassano delle Murge, Santeramo, Noci, Locorotondo, Alberobello, Castellana e Martina Franca, ma è presente con esemplari di notevoli dimensioni anche negli ambiti agricoli in prossimità dei muri a secco a delimitazione degli appezzamenti. Queste stazioni coincidono con il limite occidentale dell'areale di *Quercus trojana*, che risulta ampiamente diffusa nei Balcani (Erzegovina, Dalmazia, Montenegro, Albania, Macedonia, Epiro, Peloponneso occidentale).

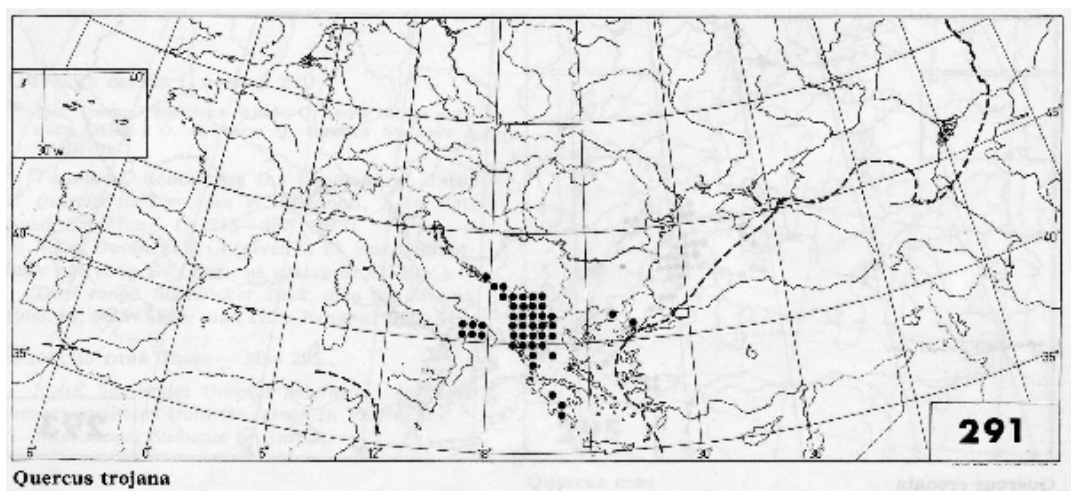


Figura 1. Areale di distribuzione di *Quercus Trojana* Webb.



Figura 2. Distribuzione di *Quercus trojana* Webb in Italia secondo Maselli (1940) modificato da Vita et al. (1988 e 1989).

Il fragno tuttavia, è presente con esemplari di notevoli dimensioni anche in limitate e circoscritte aree ricadenti all'interno del Parco Nazionale dell'Alta Murgia e facenti parte della Murgia di Nord-Ovest in agro di Altamura e di Ruvo di Puglia.

In base alla composizione floristica, alle esigenze ecologiche, i boschi a fragno presenti sulla Murgia pugliese di sud-est mostrano un chiaro carattere termofilo; infatti nelle formazioni tipiche sono presenti numerose sclerofille arboree, arbustive e lianose come leccio, fillirea, robbia peregrina, rosa di S. Giovanni, caprifoglio, lentisco, viburno tino. Gli esemplari in gruppi o isolati presenti invece sulla Murgia di nord-ovest si accompagnano ad elementi più termofili e decidui come perastro, roverella, prunus spinosa.

La sporadica e singolare presenza del fragno sulla Murgia di nord-ovest ha determinato la presente ricerca, finalizzata a comprendere le motivazioni di una localizzazione così spinta in ambienti differenti per condizioni climatiche da quelli in cui la specie è endemica ovvero per utilizzare le piante come matrici di seme per la produzione di materiale di propagazione da riutilizzare negli interventi selvicolturali sull'Alta Murgia.



Figura 3. Maestoso esemplare isolato di fragno presente in loc. Masseria Modesti in agro di Ruvo di Puglia

Sotto il profilo conservazionistico il presente lavoro di ricerca può rappresentare una solida base scientifica per la “*conservation in practice*” di popolazioni vegetali che sperimentano un declino demografico.

In organismi sessili, come le piante forestali, il movimento dei geni avviene principalmente attraverso la dispersione del polline e la disseminazione. Di conseguenza, la distanza esistente tra gli individui e l’assenza di habitat adatti all’insediamento dei semi possono limitare fortemente la *fitness* di una popolazione.

La distribuzione spaziale della variabilità genetica è stata studiata diffusamente in specie forestali, evidenziando diversi possibili scenari. Molti studi hanno dimostrato l’esistenza di un’aggregazione di genotipi simili su piccola scala spaziale, mentre in alcuni altri è stata riscontrata una debole strutturazione oppure una distribuzione casuale dei genotipi nello spazio. Ognuna di queste possibili situazioni può essere interpretata come il risultato dell’azione di differenti forze evolutive, quali la storia demografica della popolazione, il livello del flusso genico e la selezione. Per tutti questi motivi, per programmare un piano di conservazione e gestione si è ritenuto indispensabile prima di tutto uno studio della diversità genetica delle popolazioni di *Quercus trojana* presenti sull’Alta Murgia e su quelle di sud-est.

Lo studio proposto ha, pertanto, avuto come obiettivo quello di indagare sul grado di variabilità genetica e di differenziazione della popolazione isolata di fragno presente in agro di Altamura mediante il confronto con quelle localizzate nell’areale tipico della Murgia tarantina. Per valutare la

diversità genetica dei popolamenti presenti nella Murgia pugliese, sono stati utilizzati marcatori microsatellitari (SSR) sviluppati nel genere *Quercus*. I marcatori microsatellitari sono stati ritenuti i più idonei al tipo di ricerca condotta poiché permettono di analizzare regioni ripetute del genoma molto variabili tra individui della stessa specie e tra le differenti specie.

Il lavoro di ricerca è iniziato con una serie di indagini esplorative sul territorio del Parco nazionale dell'Alta Murgia finalizzate alla ricerca di popolamenti, alberi singoli o in gruppi appartenenti alla specie *Quercus trojana*. Le indagini sono state condotte sulla base di informazioni ricavate dalla carta fitosociologica relativa al territorio del Parco e facente parte dei documenti del Piano per il Parco in fase di approvazione da parte della Regione Puglia, dalla "Fitostoria descrittiva della Provincia di Bari" (dall'omonima pubblicazione del dott. Antonio Amico) (P. Rosario Capp.) Istituto di botanica dell'Università di Bari – 1955, da segnalazioni degli agricoltori e dei proprietari di boschi le cui proprietà ricadono nell'area protetta.

Alla fine della ricerca bibliografica i territori indagati sono stati quelli di Ruvo di Puglia, Altamura, Toritto, Santeramo in Colle, Cassano delle Murge.

Alcune delle informazioni raccolte non hanno sortito risultati positivi probabilmente a causa del taglio o della morte delle piante, in particolare non sono state ritrovati esemplari di fragno nel territorio di Toritto, all'interno dei popolamenti quercini a prevalenza di Roverella s.l., ricadenti nelle località "Il Quarto", "La sentinella" dove invece i proprietari dei suoli avevano memoria della presenza di tali piante.

I siti di ritrovamento del fragno censiti all'interno dell'area del Parco Nazionale dell'Alta Murgia sono stati i seguenti:

N.ro	Comune - località	Tipologia del ritrovamento
1	Altamura - Loc. Lama Corriera	Popolamento puro e isolato di fragno di circa un centinaio di piante
2	Ruvo di Puglia - Loc. Masseria Modesti	Albero isolato di circa un secolo di età
3	Cassano delle Murge – Loc. Masseria Giustino	Ampia presenza di esemplari di fragno varia età frammentati a Roverella s.l.

Aree con presenza di fragno individuate per il confronto dei materiali genetici localizzate al di fuori dei confini del Parco Nazionale dell'Alta Murgia:

N.ro	Comune - località	Tipologia del ritrovamento
1	Santeramo Loc. - Loc. Bosco Parata	Ampia presenza di esemplari di fragno varia età frammentati a <i>Quercus pubescens</i> s.l.

2	Noci - Loc. S. Maria della Scala e loc. Mass. Don Blugno	Pascolo arborato caratterizzato da prevalente presenza di fragno
3	Locorotondo - Località Mass. Rocchetta	Popolamento puro ed omogeneo di fragno in zona centrale dell'areale di massima distribuzione

Le aree censite sono state inserite in un sistema geografico informatizzato a disposizione dell'Ente Parco al fine di realizzare una mappa delle aree censite.

Nel periodo della distensione fogliare (primavera 2012), ottimale per la conduzione delle analisi genetiche, è stata effettuata la raccolta del materiale fogliare da sottoporre ad analisi del DNA.

Il prelievo è stato effettuato dai ricercatori dell'Istituto di Biologia Agro-Ambientale e Forestale (IBAF) del CNR di Terni (TR).

Per ogni area di rilevamento, ed in base alle dimensioni del popolamento, è stato raccolto un numero variabile da 13 a 26 campioni fogliari, corrispondenti al numero di piante rilevate, tranne che in loc. Masseria Modesti ove era presente una sola pianta isolata che è stata analizzata solo in parte in quanto non è stato possibile condurre alcuna analisi di popolazione.

Sito di raccolta	N°campioni fogliari corrispondenti al n.ro di piante rilevate
Masseria Giustino Cassano Murge	14
Masseria Rocchetta Locorotondo	14
Lama Corriera Altamura	26
Bosco Parata Santeramo in Colle	13
Santuario S. Maria della Scala Noci	20
Masseria Modesti Ruvo di Puglia	1

Tabella 1. Siti di raccolta, coordinate e numero di campioni

Sono stati utilizzati in totale 88 individui per le analisi genetiche.

Ogni pianta, da cui è stato effettuato un prelievo fogliare, è stata segnalata con l'applicazione di una targhetta recante un di codice univoco per la precisa identificazione ed inoltre è stata rilevata con apparecchiatura GPS My NAV 600 Professional, ai fini, attraverso elaborazioni in ambiente GIS, della compilazione di una scheda topografica completa di documenti cartografici e fotografici per la precisa individuazione della località e degli alberi selezionati.

I campioni fogliari, conservati durante il trasporto in gel di silice, sono stati analizzati presso i laboratori dell'IBAF.

Nei laboratori dell'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale (IBAF) di Terni sono state eseguite le analisi genetiche sui campioni di foglie di *Q. trojana* raccolti nel Parco Nazionale dell'Alta Murgia.

I microsatelliti utilizzati, conosciuti anche come Simple Sequenze Repeats (SSRs), consistono in corte sequenze di DNA ripetute (1-5 bp) presenti abbondantemente nel genoma di tutti gli organismi eucarioti, sono marcatori codominanti (si riesce cioè a discriminare tra omozigoti ed eterozigoti), sono ipervariabili e riproducibili. Queste caratteristiche rendono gli SSR un utile strumento per numerose applicazioni in genetica forestale, infatti vengono utilizzati in studi di mapping, di paternità, di diversità genetica e flusso genico.

I marcatori SSR si ottengono per amplificazione specifica (PCR reaction) di un singolo locus di DNA contenente motivi microsatellitari ripetuti (es. AT...CG..). La Reazione a Catena della Polimerasi (PCR o Polimerase Chain Reaction) è una tecnica che permette la produzione di una grande quantità di copie di un determinato frammento di DNA. La reazione avviene grazie all'utilizzo di due oligonucleotidi (primers), che hanno una lunghezza variabile e che sono complementari alle estremità della regione bersaglio. L'elevata variabilità delle regioni microsatellitari consente di amplificare e visualizzare numerosi alleli fornendo una stima della diversità genetica tra i campioni e tra le popolazioni.

Nella figura 4 è schematizzata la tecnica di amplificazione delle regioni microsatellitari.

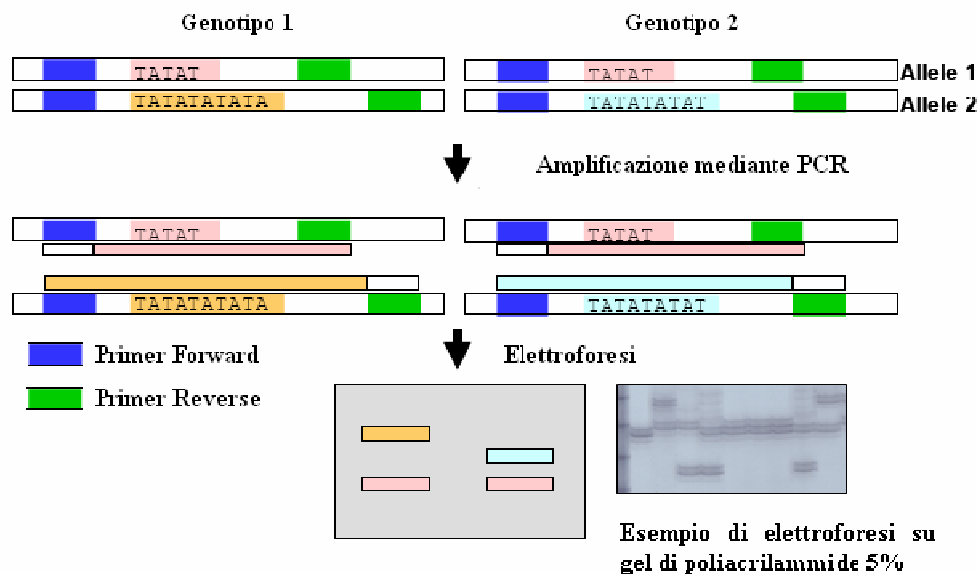


Figura 4: esempio di amplificazione della regione microsatellitare

Estrazione del DNA dai campioni di foglie

Per ogni campione sono stati pesati 50 mg di tessuto fogliare e da essi è stato estratto il DNA genomico.

I campioni vegetali sono stati macinati con azoto liquido ed il DNA è stato estratto con il kit commerciale “Dneasy plant mini-kit” della ditta Qiagen.

Per verificare la quantità e la qualità del DNA estratto è stata condotta un'elettroforesi su gel di agarosio all' 1%. In figura 5 sono visualizzati alcuni campioni di DNA della località Parata.

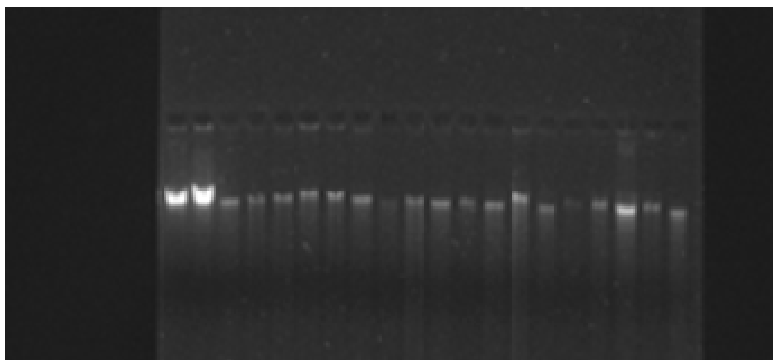


Figura 5: elettroforesi su gel di agarosio

Selezione e Screening dei Primers per il genere Quercus

È stata fatta una ricerca bibliografica per individuare i primers microsatellitari sviluppati su altre specie del genere Quercus e da poter testare sulla specie Q.trojana.

Sono stati selezionati 10 primers sviluppati in Q. robur and in Q. Petrea (O. Lepais 2006. Silvae genetica 55: 4-5). In tabella 2 sono riportate le sequenze dei primer, la dimensione in paia di basi (bp) dei frammenti amplificati e la temperatura di anealing della reazione di PCR.

Primers	Sequenza	Lunghezza (bp)	T Annealing (°C)
QrZAg11	CCTTGAACTCGAAGGTGTCCTT GTAGGTCAAACCATTGGTTGACT	242-286	50
QrZAG39	CACCGCTGGAATTTTAAGGGA GACCTAAGCCAAAGTGTGGGC	103-139	48
QrZAG96	CCCAGTCACATCCACTACTGTCC GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA	135-194	55
QrZAG87	TCCCACCACTTTGGTCTCTCA GTTGTCAGCAGTGGGATGGGTA	101-141	56
QrZAG112	TTCTTGCTTTGGTGC GCG GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC	85-96	48
QpZAG110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT	193-235	50

STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO

	GATCTCTTGTGTGCTGTATT		
QrZAG5b	TGAAGAGTAAGACCATTACATCA GTATGTGAGTGTTTGTGGTTTGG	217-263	52
QrZAG7	CAACTTGGTGTTCGGATCAA GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC	115-153	50
QrZAG20	CCATTAAGAAGAAGCAGTATTTGT GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA	160-200	48
QrZAG65	CAGTGGTGTCAACTCCTCCCAG GTCAGGTGACCATTCAAACCTAGAA	249-306	52
MsQ13	ACACTCAGACCCACCATTTTCC TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG	191-221	50

Tabella 2 Primers utilizzati nello screening.

In figura 6 sono riportati alcuni risultati ottenuti. In figura 6A e figura 6C si osserva il prodotto di amplificazione corrispondente alle dimensioni attese. Mentre in B non si è avuta amplificazione del frammento.

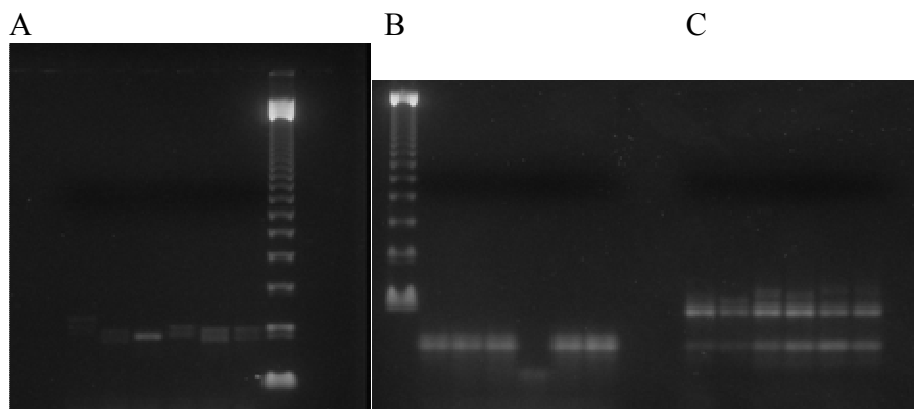


Figura 6: risultati ottenuti

I primers che hanno dato prodotti di amplificazione chiari e riproducibili sono stati selezionati per valutare la diversità genetica di tutti i campioni raccolti.

Sono stati scelti 6 loci da amplificare: QpZAG110, QrZAG7, QrZAG11, QpZAG36, QpZAG39, QpZAG9. Per l'amplificazione sono state utilizzate due metodiche differenti: la PCR multiplex e l'amplificazione con primer M13.

Le reazioni di PCR sono state eseguite su tutti i campioni appartenenti alle località indagate.

Per la PCR multiplex i primer forward di ciascuna coppia sono stati marcati con molecole fluorescenti in modo che il prodotto di amplificazione fosse rilevabile con elettroforesi capillare eseguita con il sequenziatore ABI 3100 (Applied Biosystems). Sono state messe a punto due PCR multiplex, si sono amplificati cioè più loci nella stessa reazione. I primer da utilizzare contemporaneamente nella reazione di PCR sono stati scelti in base alle dimensioni dei frammenti e alla complementarità dei primers. Le mix sono state organizzate come riportato in Tabella 3

MIX	Primers	Sequenza	Marcatore Fluorescente
Mix 1	QrZAG110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT GATCTCTTGTGTGCTGTATTT	FAM
	QrZAG7	CAACTTGGTGTTCCGGATCAA GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC	VIC
Mix2	QrZAG11	CCTTGAACCTCGAAGGTGTCCTT GTAGGTCAAACCATTGGTTGACT	VIC
	QrZAG39	CACCGCTGGAATTTTAAGGGA GACCTAAGCCAAAGTGTGGGC	VIC

Tabella 3: primer utilizzati nelle MIX1 e MIX2.

Le PCR sono state eseguite utilizzando il KIT “Type-it” della ditta Qiagen per la reazione Multiplex. I loci QpZAG36 e QpZAG9 sono stati invece amplificati con il metodo M13. La metodica M13 (tailed primers) consiste nell’unire all’estremità 5’ del primer forward una sequenza M13 di 19 basi. In questo modo nella reazione PCR vengono utilizzati 3 primers: forward, M13 marcato, revers.

I frammenti amplificati con entrambe le metodiche sono stati analizzati al sequenziatore capillare ABI 3100 per individuare i differenti alleli. In figura 7 è riportato un esempio di un campione proveniente dalla località Giustino analizzato con elettroforesi capillare.

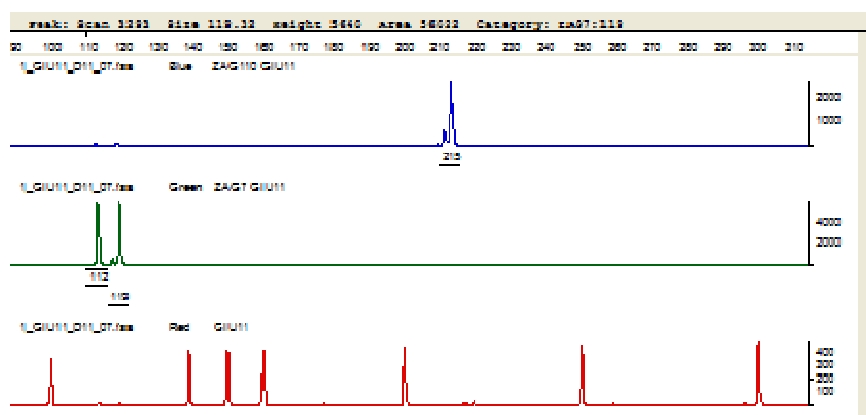


Figura 7: esempi dell’analisi effettuata sui campioni vegetali prelevati in località masseria Giustino.

In blu è il locus Qzag110; il campione è omozigote 215. In Verde è rappresentato il locus Qzag07; il campione è eterozigote con alleli 112 e 119. In rosso è rappresentato il ladder GENESCAN ROX500

I dati grezzi sono stati elaborati con il programma Genescan e Genotyper (Applied Biosystem).

Sono stati individuati alcuni campioni che dovevano essere ripetuti perché l'amplificazione non aveva dato risultati oppure perché il segnale al sequenziatore era troppo basso. Terminata questa fase è stata costruita una matrice con i valori degli alleli per ogni locus e per ogni campione.

I dati sono stati poi elaborati con i programmi di analisi statistica utilizzati per studi di genetica di popolazioni come GenAlex, POPGENE, Arlequin e Structure.

Analisi dei dati

Diversità genetica delle popolazioni

Utilizzando il programma GenAlex (Peakall and Smouse, 2005) sono stati calcolati i seguenti indici di diversità genetica: eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_e), indice di diversità di Shannon (I). Gli indici di fissazione di Wright sono stati calcolati con il programma Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Questi indici, misurando il deficit o l'eccesso di eterozigoti in una popolazione campionata, forniscono indicazioni sia sul processo d'inbreeding rispettivamente all'interno di ogni subpopolazione (F_{is}) e della popolazione nella sua totalità (F_{it}), e della differenziazione genetica tra le subpopolazioni (F_{st}). Il programma HP-RARE (Kalinowski, 2005) è stato utilizzato per calcolare la ricchezza allelica (A_r) e la ricchezza degli alleli privati (P_{Ar}) delle popolazioni.

Struttura delle popolazioni

La distanza e la struttura genetica delle popolazioni è stata valutata utilizzando differenti approcci: l'Analisi delle Coordinate Principali, un'analisi Bayesiana e l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA).

Il programma GeneALEX6.0 è stato utilizzato per eseguire l'analisi delle coordinate principali basata sulle matrici dei valori di F_{st} e di distanza genetica di Nei (Nei 1973). Il programma STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) è stato utilizzato per valutare la struttura delle popolazioni, l'appartenenza delle popolazioni ai differenti gruppi (clusters) e la frazione di genoma (valore-Q) che ogni individuo ha ereditato dai vari clusters sono state stimate usando un approccio Bayesiano combinato con il metodo di simulazione Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Questo metodo individua il numero più probabile di clusters presenti con contemporanea assegnazione degli individui ai medesimi, minimizzando il linkage disequilibrium e la deviazione dall'equilibrio

di Hardy-Weinberg. L'analisi mediante STRUCTURE è stata effettuata utilizzando il modello di mescolanza (admixture model) sull'intero set di dati senza fornire informazioni a priori sulle popolazioni e presupponendo correlazione tra le frequenze alleliche.

La varianza Molecolare AMOVA è stata calcolata con il programma Arlequin.

In tabella 4 sono riportati i risultati relativi ai singoli loci calcolati considerando il totale degli individui analizzati. Si osserva che un numero maggiore di alleli (N_e) vengono amplificati per i loci ZAG110 e ZAG7, mentre per locus ZAG11 si hanno un massimo di 3 alleli. Valori di Fis positivi si sono ottenuti per i loci ZAG10, ZAG9, ZAG11 indicando un eccesso di campioni omozigoti.

Locus	Ne	Ht	Mean		Fis	Fit	Fst
			He	Ho			
ZAG110	7.191	0.894	0.854	0.745	0.128	0.168	0.046
ZAG7	8.252	0.928	0.868	0.902	-0.039	0.028	0.064
ZAG36	4.326	0.794	0.766	0.806	-0.053	-0.015	0.036
ZAG9	3.130	0.700	0.651	0.458	0.297	0.346	0.070
ZAG11	2.366	0.623	0.532	0.139	0.739	0.777	0.146

Tabella 4: Indici di diversità genetica per ciascun locus, numero medio di alleli effettivi (N_e), eterozigosità totale (Ht), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He), coefficiente di inbreeding (Fis), differenziazione sul totale degli individui (Fit) e tra le popolazioni (Fst).

In tabella 5 sono riportati i valori di diversità genetica per le singole popolazioni. La popolazione di Lamacorriera mostra un numero di alleli ($N_e = 3.6$) e un valore di diversità genetica ($I = 1.48$) più bassi rispetto a tutte le altre popolazioni. Le popolazioni di Giustino, Locorotondo e Santuario hanno valori di diversità genetica più alti, rispettivamente $I = 1.73$, 1.74 e 1.72 . Tuttavia la popolazione di Lamacorriera ha un valore alto di alleli privati ($PAr = 0.89$) e il coefficiente di inbreeding (Fis) all'equilibrio. I campioni raccolti nel sito di Giustino hanno un valore di ricchezza allelica ($Ar = 7.35$) e di ricchezza di alleli privati ($PAr = 1.18$) più alta rispetto alle altre popolazioni, un valore alto di ricchezza di alleli privati si trova anche nel sito di Santuario ($PAr = 0.85$). Il coefficiente di inbreeding è positivo e significativo solo nelle popolazioni Santuario e Giustino indicando un eccesso di individui omozigoti.

STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO

Pop		N	Ne	I	Ho	He	UHe	Fis	Ar	PAr
Giustino	Mean	14	5.403	1.736	0.546	0.799	0.795	0.206**	7.35	1.18
	SE		1.318	0.243	0.284	0.112	0.053	0.127		
Locorotondo	Mean	14	5.496	1.747	0.641	0.814	0.817	0.105	7.18	0.49
	SE		1.051	0.210	0.184	0.097	0.042	0.094		
Lamacorriera	Mean	26	3.653	1.478	0.652	0.640	0.652	-0.03	6.20	0.89
	SE		0.764	0.256	0.382	0.246	0.110	0.187		
Parata	Mean	13	5.246	1.590	0.647	0.788	0.737	0.018	6.95	0.43
	SE		1.505	0.346	0.170	0.209	0.096	0.182		
Santuario	Mean	20	5.466	1.702	0.689	0.768	0.788	0.106*	6.76	0.85
	SE		1.566	0.265	0.162	0.046	0.047	0.186		

Tabella 5: Diversità genetica di cinque popolazioni calcolata mediante cinque loci microsatellitari: numero di individui analizzati (N), numero medio di alleli effettivi (Ne), indice di Shannon (I), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He), eterozigosità attesa pesata sul numero di campioni (UHe), coefficiente di inbreeding (Fis), ricchezza allelica (Ar), ricchezza di alleli privati (PAr)

Per valutare la divergenza e la struttura delle popolazioni campionate sono state eseguite le analisi delle principali Coordinate (PCA), della varianza molecolare (AMOVA) ed è stato utilizzato un approccio Bayesiano utilizzando il programma STRUCTURE.

In tabella 6 e tabella 7 sono riportate le matrici di distanza tra le popolazioni calcolate con i valori di Fst (differenziazione tra le popolazioni) e di distanza genetica di Nei. La popolazione di Lamacorriera risulta la più divergente. Infatti in entrambe le matrici i valori di distanze maggiori si osservano tra Lamacorriera e le altre quattro popolazioni.

	Masseria Giustino (Cassano delle murge)	Mass. Rocchella (Locorotondo)	Lama Corriera (Altamura)	Parata (Santeramo)	Santuario (Noci)
Masseria Giustino	0.000				
Locorotondo	0.228	0.000			
Lama Corriera	0.313	0.420	0.000		
Bosco Parata	0.186	0.263	0.352	0.000	
Santuario	0.260	0.134	0.386	0.207	0.000

Tabella 6: Misure della distanza genetica tra cinque popolazioni di Q.trojana calcolata per ogni coppia di popolazioni tramite indice di Nei (1973).

	Giustino	Locorotondo	Lama Corriera	Parata	Santuario
Giustino	0.000				
Locorotondo	0.028	0.000			
Lama Corriera	0.063	0.075	0.000		
Parata	0.032	0.042	0.085	0.000	

Santuario	0.032	0.017	0.074	0.036	0.000
-----------	-------	-------	--------------	-------	-------

Tabella 7: Misure della distanza genetica tra cinque popolazioni di *Q.trojana* calcolata per ogni coppia di popolazioni tramite i valori di *Fst*.

In figura 8A e 8B sono riportati i risultati delle analisi delle principali coordinate basate sui i valori di *Fst* (8A) sui i valori della diversità di Nei (8B). Le due rappresentazioni sono simili. Si osserva che la popolazione di Lama Corriera è quella più distante dalle altre. Mentre le popolazioni di Locorotondo e Santuario S. Maria della Scala sono più simili tra loro così come le popolazioni di Masseria Giustino e Bosco Parata.

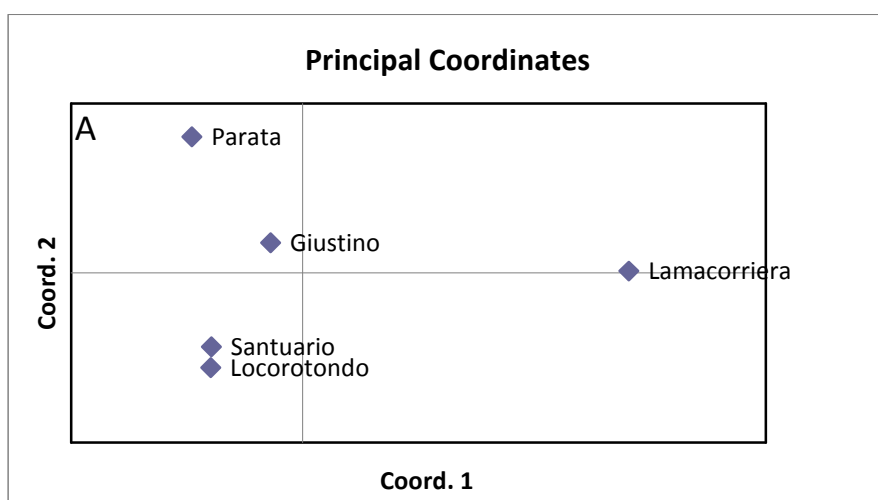


Figura 8A: Analisi delle Coordinate Principali delle 5 popolazioni di *Q. trojana* basata sui valori della distanza genetica calcolata per ogni coppia di popolazioni tramite valori di *Fst*.

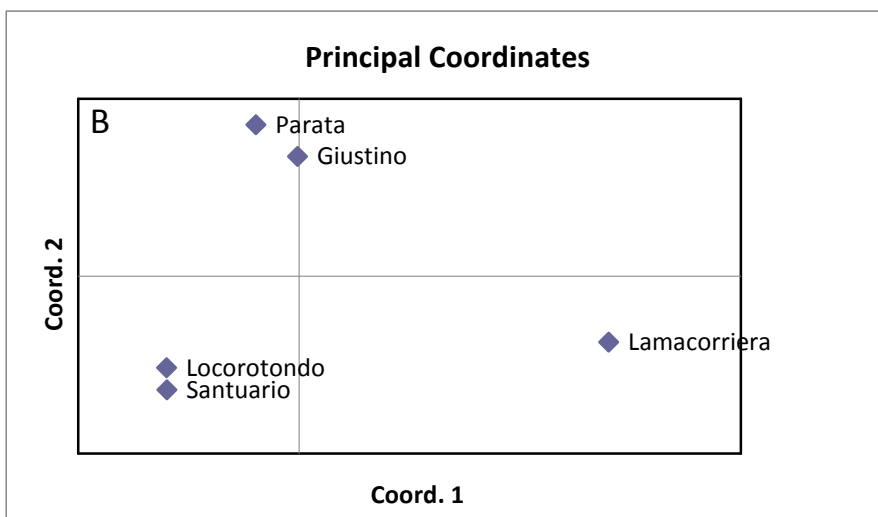


Figura 8B: Analisi delle Coordinate Principali delle 5 popolazioni di *Q. trojana* basata sui valori della distanza genetica calcolata per ogni coppia di popolazioni tramite valori di Nei (1973).

Un risultato simile si osserva dalla analisi di STRUCTURE. In figura 7A sono riportati i valori di Delta K cioè il numero di gruppi più probabili in cui possono essere suddivisi i campioni. Il

raggruppamento più probabile è $K=2$, cioè si ha una maggiore probabilità che i campioni di Quercus trojana analizzati siano suddivisi in due gruppi ($K=2$), un altro raggruppamento, con una minore probabilità statistica, è $K=3$ cioè tre gruppi.

La rappresentazione grafica dell'analisi di struttura si può osservare in figura 9B, 9C. Nella figura 9B i due gruppi sono rappresentati dai due colori; blu (gruppo1) rosso (gruppo 2). Ogni linea verticale rappresenta un individuo. Si osserva che la maggior parte degli individui della popolazione Lama Corriera appartengono al gruppo 1 (blu), mentre nella altre popolazioni è predominante l'appartenenza al cluster 2 (rosso). Per il raggruppamento meno probabile $K=3$ i tre gruppi sono rappresentati con i colori rosso (gruppo 1), verde (gruppo 2) e blu (gruppo 3). Anche in questo caso è chiara la separazione di Lama Corriera dalle altre 4 popolazioni. I campioni di questo sito infatti appartengono principalmente al cluster 1(rosso). Interessante è la congruenza dei dati genetici con la localizzazione geografica dei popolamenti. Nella Tavola d'inquadramento, allegata alla presente relazione, si può infatti constatare che il sito di Lama Corriera è quello geograficamente più isolato dal resto dei popolamenti. Le popolazioni di Santuario Santa Maria della Scala e Locorotondo sono tra loro più vicine così come Parata e Giustino.

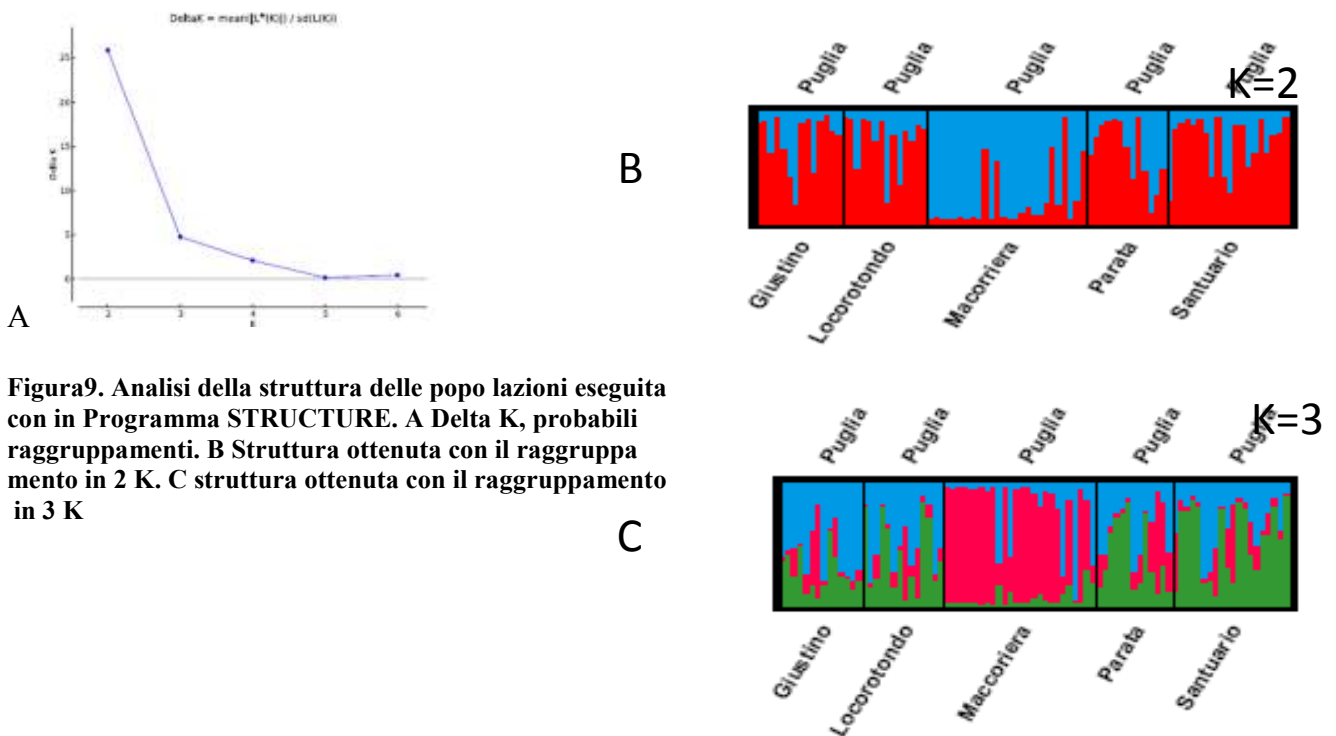


Figura9. Analisi della struttura delle popolazioni eseguita con in Programma STRUCTURE. A Delta K, probabili raggruppamenti. B Struttura ottenuta con il raggruppamento in 2 K. C struttura ottenuta con il raggruppamento in 3 K

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation indices
Among populations	4	15.208	0.06219 Va	3.84	Fis 0.0786* Fst 0.0383* Fit 0.1134*
Among individuals within populations	82	137.918	0.12257 Vb	7.56	
Within individuals	87	125.000	1.43678 Vc	88.61	
Total	173	278.126	1.62154		

Tabella 8. Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA). E indici di fissazione

Conclusioni dell'analisi genetica

I risultati delle analisi molecolari eseguite su campioni di *Q. trojana* si sono dimostrate un ottimo strumento per fornire indicazioni sulla variabilità all'interno dei popolamenti e sulla diversità genetica tra questi. Utilizzando questi dati è possibile ipotizzare alcune misure per la conservazione e la gestione delle risorse genetiche.

Considerando i valori di diversità intra-popolazione tra le popolazioni, meritano una maggiore attenzione i popolamenti di Lama Corriera, Masseria Giustino e Santuario S. Maria della Scala.

La struttura delle popolazioni indica che i campioni analizzati possono essere raggruppati con maggiore probabilità in due pool genici (K=2). La maggioranza degli individui della popolazione di Lama Corriera appartengono ad un unico pool genico (gruppo 1= blu), mentre nelle altre popolazioni si osserva una prevalenza di individui appartenenti al gruppo 2 (rosso) ed alcuni individui appartenenti al gruppo 1. La minore diversità genetica e la ricchezza di alleli privati osservate nei campioni di Lama Corriera suggeriscono un probabile isolamento della popolazione, tuttavia i valori di eterozigosità e di Fis non evidenziano fenomeni di inbreeding. La maggior parte dei campioni raccolti nei siti di Masseria Giustino e Santuario S. Maria della Scala appartengono al gruppo 2. In queste aree si osserva il maggiore valore di diversità genetica intra-popolazione, un'elevata ricchezza allelica e un elevato valore di alleli privati.

Come riportato in letteratura (Petit et al. 1997) una delle misure più utili per identificare le popolazioni da conservare è la ricchezza allelica. Un alto livello di variazione genetica può aumentare il potenziale per rispondere alla selezione (Kalinowski et al. 2004). Anche gli alleli rari

STUDIO PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA E DENDROLOGICA DI UNA POPOLAZIONE ISOLATA DI QUERCUS TROJANA FINALIZZATO ALLA DEFINIZIONE DELLE RELAZIONI CON ALTRE POPOLAZIONI PRESENTI NELL'AREALE PUGLIESE DEL FRAGNO E PER LA INDIVIDUAZIONE DI ELEMENTI IDONEI ALLA PRODUZIONE DI SEME CERTIFICATO

meritano attenzione perché possono essere correlati con l'adattamento a differenti condizioni ambientali. Tenendo conto di ciò si possono indicare le popolazioni di Lama corriera, MaseriaGiustino e Santuario come quelle con una maggiore priorità per la conservazione e da utilizzare in programmi di gestione delle risorse genetiche.

L'utilizzo del germoplasma delle popolazioni di Lama Corriera, Masseria Giustino e Santuario S. Maria della Scala per la produzione di seme certificato garantirà la conservazione dei differenti pool genetici e della ricchezza allelica presente nell'area del Parco Nazionale dell'Alta Murgia.

Analisi dendrometrica

L'analisi dendrometrica condotta dal dottore Forestale Filippo Moretti ha previsto la realizzazione di una scheda per ogni singola pianta da cui sono stati prelevati i campioni fogliari, contenente i seguenti dati:

1. comune;
2. dati catastali;
3. località;
4. coordinate UTM nel sistema WGS 84
5. diametro del fusto all'altezza di 1,30 m da terra;
6. circonferenza al colletto;
7. altezza dendrometrica;
8. altezza di intersezione della chioma;
9. profondità chioma;
10. area d'insidenza;
11. percentuale chioma viva;
12. stato fitosanitario;
13. età presumibile;
14. note riguardanti gli aspetti della piante (forma, presenza di aree secche ecc.).

Al fine di illustrare meglio le aree indagate è stata prodotta anche una serie di tavole in cui sono contenute informazioni geografiche:

1. stralcio IGM delle aree di rilievo;
2. stralcio catastale;
3. ortofoto con localizzazione delle piante oggetto di prelievo in scala 1.3000.

Le tavole e le schede di ogni singola pianta sono allegate alla presente relazione.

Verifica dei requisiti per l'inserimento dei popolamenti analizzati nella lista dei boschi da seme.

I siti indagati presentano popolamenti arborei con caratteristiche differenti sia per la tipologia delle cenosi arboree sia per le condizioni stazionali. Sotto l'aspetto della diversità i popolamenti di fragno indagati in località Masseria Giustino e Santuario S. Maria della Scala presentano un elevato valore di diversità genetica intra-popolazione ed un'elevata ricchezza allelica, queste caratteristiche rendono le piante idonee alla produzione di seme per la riproduzione della specie.

D'altra parte il popolamento in agro di Altamura in località Lama Corriera presenta particolarità genetiche (alto valore di eterozigosità) fanno presupporre alla presenza in passato di un più ampio gruppo di piante di fragno che è andato col tempo riducendosi per cause antropiche o per altre sconosciute. Pertanto gli individui oggi presenti, circa un centinaio potrebbero essere il relitto di un popolamento puro ben adattato a quelle condizioni stazionali che rappresentato ad oggi le più estreme dell'areale pugliese. Si ritiene perciò che le piante di fragno presenti in località Lama

Corriera costituiscano ecotipi idonei alla riproduzione e diffusione della specie sull'Alta Murgia.

Programma di raccolta, riproduzione del materiale di propagazione ed utilizzo del materiale riprodotto da seme in interventi forestali

Recentemente vi è un crescente interesse nella gestione dei boschi per la produzione di ghiande destinate sia alla produzione vivaistica sia all'alimentazione della fauna. In questo senso va ricordato che più di 200 specie animali si cibano del frutto delle querce.

Le risorse genetiche rappresentate dalle querce mediterranee, la loro grande variabilità ed il loro ruolo chiave a livello ecologico fanno della regione mediterranea un'area importante per la biodiversità.

Non si può affermare che siano minacciate a livello di specie, ma i numerosi ostacoli posti alla propagazione naturale, come la frammentazione del territorio e la mancanza di animali che favoriscono la dispersione delle ghiande, creano difficoltà per il mantenimento della variabilità genetica.

Si ritiene, in genere, che la morfologia e le modalità di crescita dei semenzali del genere *Quercus* riflettano risposte evolutive sia all'*habitat* sia alla dimensione del seme. Ad esempio, le specie spontanee in ambienti xerofitici mostrano generalmente semenzali relativamente piccoli.

La fruttificazione delle querce è condizionata dal clima, dalla durata del ciclo riproduttivo, dalla presenza di insetti e predatori, dall'età e dimensione dell'albero, dalla posizione dei fiori nella chioma e dalla capacità genetica individuale per la produzione di ghiande. Più è lungo il ciclo riproduttivo di una specie, più sono probabili i rischi di avversità. Nelle specie quercine anche la fruttificazione è irregolare: le produzioni eccezionali (pascione), superiori a 600.000 ghiande/ha, avvengono ogni 2-5 anni, in relazione alla stagione ed alla specie, ma l'intervallo può aumentare a causa di numerosi fattori tra i quali l'inquinamento atmosferico. In stazioni senza rischi di gelate si effettua la semina autunnale subito dopo la raccolta; altrimenti si procede alla semina primaverile di ghiande stratificate durante l'inverno, generalmente all'aperto, ma anche in ambienti termoregolati (tra +1 e +5°C) ed eventualmente con ghiande già pregerminate. La vernalizzazione non serve a rimuovere la dormienza (ritenuta trascurabile o inesistente nelle specie quercine mediterranee), ma soprattutto a ritardare la germinazione fino alla primavera successiva. Le semine autunnali vanno protette contro i roditori e, nelle stazioni fredde, pacciamate. Il cumulo di stratificazione va controllato periodicamente, soprattutto alla fine dell'inverno, per interrompere il trattamento prima che il fittone si sia allungato troppo. Per effettuare la semina di ghiande pregerminate la lunghezza ottimale della radice è di 0,5-5 cm, ma si possono impiegare semi con fittoni più lunghi che, al momento della sistemazione nel terreno o nei contenitori, possono essere recisi fino a 3 cm senza

conseguenze negative sull'attecchimento. La presenza di larve, generalmente di curculionidi, non compromette la germinazione, sempre che l'embrione non sia stato danneggiato.

I frutti delle querce sono recalcitranti, ossia, la perdita di umidità influisce negativamente sulla loro vitalità. Dal momento della raccolta fino alla semina il contenuto di umidità delle ghiande non dovrebbe scendere al di sotto del 40%; il tenore idrico ideale è compreso tra il 42 ed il 48%, ma varia con la specie. Per la vernalizzazione e la semina le ghiande vanno collocate nella loro posizione naturale (orizzontale) per favorire la normale conformazione dell'apparato radicale e di quello epigeo. La conservazione delle ghiande per 3-4 anni è possibile in ambienti con temperature comprese tra -3 e -1°C (a +1°C i semi sono già in grado di germinare) che consentano, in ogni caso, la rimozione di eventuali accumuli di biossido di carbonio. I semi vanno frammisti a torba asciutta (ma non disidratata) e sistemati in contenitori da 30-60 litri che permettano lo scambio gassoso, assicurato generalmente da un tubo con pareti forate (di 10 cm di diametro ed altezza pari a quella del bidone) da sistemare verticalmente al centro. Il contenitore va socchiuso con un foglio di carta, porosa ma resistente, sul quale poggia il coperchio. In alcuni stabilimenti europei per la lavorazione del seme, le ghiande si sottopongono a termoterapia (bagno in acqua a +41°C per 2 o 3 ore) contro il fungo *Ciboria batschiana* e si conservano, senza mescolarle ad alcun substrato, in cassette di plastica forate da 30-50 litri di capacità. Le cassette, non completamente riempite, vengono sistemate all'interno di grossi contenitori (300-400 Kg) che, a loro volta, si impilano, consentendo però un buon rapporto ossigeno/diossido di carbonio. Prima di seminare le ghiande così conservate, è bene immergerle in acqua per ripristinare il giusto livello di umidità e per separare facilmente semi non vitali e impurezze varie. Il metodo di separazione per galleggiamento funziona abbastanza bene in caso di infestazione di larve di insetti. La risposta delle varie specie alla 'lunga conservazione' (3-4 anni) non è omogenea. In alcuni casi, soprattutto se le condizioni della conservazione non sono state ottimali, si osserva una diminuzione del vigore dei semenzali ottenuti da ghiande conservate per più di due anni. Va tenuto presente che la qualità del seme condiziona sia il numero di radici secondarie permanenti sia il numero totale di radici del semenzale. La conservazione di semi recalcitranti è oggi considerata una delle più difficili sfide nell'ambito della vivaistica forestale e della gestione delle risorse genetiche.

È preferibile effettuare l'allevamento degli astoni in contenitore in quanto in questo modo le piante all'atto dell'impianto in pieno campo subiscono una perdita di radici molto ridotta ed hanno maggiori possibilità di sopravvivere al trapianto, che deve essere eseguito in autunno al fine di assicurare le migliori condizioni climatiche necessarie all'attecchimento post trapianto.