

MARTA SCALFI (\*) - STEFANO LEONARDI (\*) - PAOLO PIOVANI (\*)  
ANDREA PIOTTI (\*) - PAOLO MENOZZI (\*)

## EFFETTI DELLA FRAMMENTAZIONE SULLA STRUTTURA GENETICA DEL FAGGIO <sup>(1)</sup>

*Una gestione sostenibile dei sistemi forestali deve garantire anche la conservazione della biodiversità genetica, base del potenziale evolutivo delle specie. Per stabilire in che modo e misura i trattamenti selvicolturali incidano sulla distribuzione della variabilità genetica delle popolazioni arboree, è necessario chiarire quali siano le dimensioni della popolazione entro cui avviene flusso genico e, quindi, a che livello di frammentazione si inizi ad osservare un effetto sulla diversità genetica delle popolazioni.*

*A tal fine sono state analizzate 25 popolazioni di faggio (*Fagus sylvatica* L.) dell'Italia centrale, classificate, in base al crescente grado di isolamento, come Marginali, Cacuminali e Abissali. Trenta alberi di ogni popolazione sono stati mappati e caratterizzati con 5 marcatori microsatellite. Non sono state rilevate differenze significative tra i tre gruppi di popolazioni per quanto riguarda l'erosione genetica. L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di individuare un significativo incremento del valore di  $F_{SG}$  nel gruppo delle popolazioni ad isolamento più elevato. Dato confermato dall'analisi delle coordinate principali effettuata sulla matrice della distanza genetica a coppie delle popolazioni: il gruppo delle popolazioni Abissali presenta maggiore differenziazione rispetto alle popolazioni Marginali-Cacuminali che mostrano invece la tendenza a raggrupparsi insieme al centro del grafico.*

*Parole chiave:* *Fagus sylvatica* L.; frammentazione dell'habitat; diversità genetica; microsatellite.  
*Key words:* *Fagus sylvatica* L.; habitat fragmentation; genetic diversity; microsatellite.

### INTRODUZIONE

La frammentazione determina la suddivisione di un habitat continuo in subunità più piccole ed isolate tra le quali si interpone un ambiente diverso. Questo fenomeno rappresenta una minaccia per tutti i livelli di biodiversità definiti dalla convenzione di Rio 92: livello genetico (*entro spe-*

---

(\*) Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma. Viale delle Scienze 11/A - 43100 Parma. paolo.menzozi@unipr.it

<sup>1</sup> Lavoro svolto nell'ambito del progetto MIUR PRIN COFIN2003 FOR\_BIO «Modelli di gestione sostenibile dei sistemi forestali per la conservazione della complessità e della diversità biologica» (Coordinatore nazionale: O. Ciancio).

cie), livello di specie (*tra entità tassonomiche distinte*) e di paesaggio (*tra ecosistemi* che formano il paesaggio).

La frammentazione degli habitat avviene sia per cause naturali (per esempio i cambiamenti climatici), sia per opera dell'uomo che altera la distribuzione naturale delle popolazioni naturali (SAUNDERS *et al.*, 1991). Essa induce una riduzione delle dimensioni delle popolazioni che può avere conseguenze pesanti sulla demografia e sulla struttura genetica. La teoria prevede che la frammentazione porti inevitabilmente ad un'erosione della variabilità genetica ed ad un aumento della differenziazione tra le popolazioni. Il risultato prevedibile è quindi un aumento degli effetti della deriva genetica, un aumento del tasso di inincrocio, una riduzione degli scambi genici fra le popolazioni e un complessivo aumento della probabilità di estinzione locale. Nel breve periodo questo determina soprattutto un diminuita capacità adattativa delle specie (LANDE 1988; HARRISON e HASTINGS, 1996).

Gli effetti della frammentazione sulla biodiversità in generale sono stati oggetto di numerosi studi. Le specie arboree forestali, caratterizzate da una elevata dispersione genica via polline o via seme potrebbero, in teoria, risentire meno degli effetti della frammentazione. Tuttavia le indagini che riguardano la biodiversità genetica delle specie forestali sottoposte a frammentazione sono poco numerose (FORÉ *et al.*, 1992; YOUNG *et al.*, 1996).

Le indicazioni più recenti della letteratura (CUNNINGHAM e MORITZ, 1998; HUTCHINSON e TEMPLETON, 1999), non hanno consentito di stabilire con accuratezza un valore soglia oltre il quale gli effetti della frammentazione sono rilevabili. A questo scopo è importante stabilire quale sia la dimensione della popolazione e la distanza dall'areale continuo entro cui avviene il flusso genico e a quale livello di frammentazione si inizi ad avere un effetto sulla variabilità genetica e sulla sua ripartizione *tra* ed *entro* le popolazioni frammentate.

In questo lavoro sono state scelte 25 popolazioni di *Fagus sylvatica* (L.) dell'Italia centrale per studiare gli effetti dell'isolamento prodotto da tre livelli crescenti di frammentazione. Gli effetti della frammentazione sono studiati sia sulla variabilità genetica interna alle piccole popolazioni, sia sul loro grado di differenziamento.

## MATERIALI E METODI

### *Il campionamento*

Sono state analizzate 25 popolazioni di *Fagus sylvatica* L. dell'Italia centrale, esterne all'areale di massa del faggio nella regione.

La scelta delle popolazioni è stata effettuata in base a segnalazione del

Prof. R. Giannini (CNR Firenze) che le aveva precedentemente catalogate in tre gruppi in base alle loro caratteristiche e posizione geografica, (vedi figura 1):

- popolazioni Marginali, vicine all'areale del faggio e situate ad un'altitudine usuale per la specie a questa latitudine; in genere sono popolazioni di grandi dimensioni;
- popolazioni Cacuminali (montane) dell'Etruria centrale (Toscana, Lazio, Umbria), poste normalmente all'apice di rilievi orografici molto isolati dal resto dell'areale ad una quota ritenuta «normale» per il faggio a questa latitudine; sono popolazioni generalmente di medie dimensioni;
- popolazioni relitte Abissali dell'Etruria centro-meridionale (Toscana e Lazio). Sono di piccole dimensioni e poste a bassa quota (inferiore a 600m s.l.m.) sui versanti esposti a Nord, Nord-Est di strette vallate lontane dall'areale del faggio.

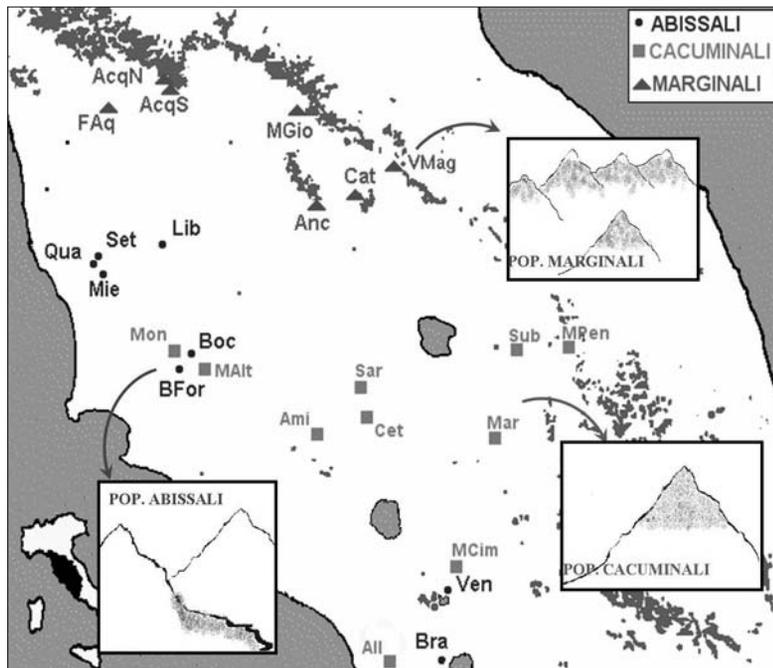


Figura 1 – Cartina dell'Italia Centrale con indicata la posizione delle popolazioni campionate. I gruppi di popolazioni sono indicate da simboli differenti: con un pallino le Abissali, un quadrato le Cacuminali e un triangolo le Marginali. Nei tre riquadri più piccoli sono schematizzate le caratteristiche dei tre gruppi di popolazioni per quanto riguarda la posizione: le parti colorate rappresentano delle foreste di faggio e l'areale.

– Map of central Italy with all the sampled populations. Population symbol is set according to the group: circle for Remote-Abyssal populations, square for Remote-Summit and triangle for Near-Marginal. In the small boxes a pictorial description of group characteristics is reported.

Questa suddivisione riflette un crescente grado di frammentazione delle popolazioni Marginali alle Abissali. L'elenco delle popolazioni con relative coordinate è riportato nella tabella 1.

In ogni popolazione sono stati campionati circa 30 individui, per ciascuno dei quali sono state raccolte alcune gemme per l'estrazione del DNA.

*Tabella 1* – Riporta l'elenco delle popolazioni campionate divise nei tre gruppi individuati: popolazioni Abissali, Cacuminali e Marginali. Per ogni popolazione è riportata la sigla assegnatale, le coordinate geografiche (latitudine e longitudine), l'altitudine e l'area approssimativa occupata dalla popolazione in ettari.

– *List of sampled populations grouped in Near-Marginal, Remote-Summit and Remote-Abysal. For every population name, label, longitude, latitude, altitude (a.s.l.) and area occupied are reported.*

Nome popolazione	Sigla	Latitudine	Longitudine	Altitudine m s.l.m.	Approx. Area (h)
<b>ABISSALI</b>					
Boccheggiano	Boc	43°05"	10°36"	500	5
Settefonti	Set	43°28"	10°36"	450	2
Libbiano	Lib	43°29"	10°59"	330	1
Bracciano	Bra	42°10"	12°09"	490	5
Monte Venere	Ven	42°21"	12°11"	550	12,5
Borro Formiccio	BFor	43°02"	11°03"	430	2
Quattrostrate	Qua	43°28"	10°36"	500	10
Miemo	Mie	43°25"	10°40"	475	2
<b>CACUMINALI</b>					
Poggio Montieri	Mon	43°08"	11°00"	980	10
Monte Cetona	Cet	42°45"	12°32"	1040	12,5
Monte Alto	MAlt	43°03"	11°08"	745	7,5
Monte Cimino	MCim	42°23"	12°12"	1030	100
Sarteano	Sar	43°00"	11°49"	700	2
Monte Martano	Mar	42°45"	12°32"	1030	4,5
Monte Subasio	Sub	43°04"	12°40"	1100	7,5
Allumiere	All	43°10"	11°49"	580	7,5
Amiata	Ami	42°54"	11°38"	1030	100
Monte Pennino	Pen	43°05"	12°52"	1250	100
<b>MARGINALI</b>					
Foro all'Anciolina	Anc	43°36"	11°41"	1365	100
Viamaggio	Vmag	43°40"	12°07"	950	100
Aquerino Sud	AqS	44°00"	11°01"	755	100
Aquerino Nord	AqN	44°00"	11°01"	880	100
Alpe di Catenaia	Cat	43°37"	11°55"	1000	100
Faggio Aquila	FAq	43°56"	10°38"	1020	1
Monte Giovi	MGio	43°55"	11°27"	900	5

### *Analisi genetiche*

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit «NucleoSpin Plant Kit» (Macherey Nagel). Gli individui sono stati caratterizzati genotipicamente a cinque loci microsatellite:

- tre disegnati in *F. sylvatica* L.: *Fs1-11*, *Fs1-25*, *Fs4-46* (PASTORELLI *et al.*, 2003);
- due disegnati in altre specie: *Quru-GA-0A01* in *Quercus rubra* (ALDRICH

*et al.*, 2002), *MFC5* in *Fagus crenata* (TANAKA *et al.*, 1999, ottimizzazione PASTORELLI *et al.*, 2003).

Le reazioni d'amplificazione sono state effettuate in un volume di 15  $\mu$ l con 1 $\times$  Fermentas PCR reaction buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M dNTPs, 6 pmol primer reverse, 1 pmol primer forward marcato in 5' con il fluoroforo Cy5 o IRD700, 0.4 U di *Taq* polimerasi e 10 ng di DNA. Tutte le amplificazioni sono state eseguite sul termociclatore PTC-100 della Celbio con copertura riscaldata secondo il seguente profilo d'amplificazione: un primo step a 94°C per 5', 10 cicli di touch down (94°C per 1', (T<sub>A+5°C</sub> - 0.5°C/ciclo per 45", 72°C per 1' e 30"), 30 cicli (94°C per 1', T<sub>A</sub> per 45", 72°C per 1' 30") e uno step finale a 72°C per 8' (dove T<sub>A</sub> indica la temperatura di annealing riportata in letteratura per i primer).

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore CEQ2000 della Beckman Coulter. Le analisi sono state eseguite in multiplex per i microsatelliti marcati con fluorofori diversi e/o con dimensioni molto differenti.

#### *Analisi statistica dei dati*

Per ogni marcatore è stato considerato il numero di alleli osservati, l'intervallo di variazione nelle dimensioni degli alleli ed il valore di eterozigosi osservata ( $H_o$ ; è la frazione di individui eterozigoti. L'eterozigosi osservata media è la media delle eterozigosi osservate per ciascun locus).

Inoltre, per ciascun microsatellite e per ciascuna popolazione è stato calcolato il valore dei parametri:

- eterozigosi attesa ( $H_e$ ), è la frazione di genotipi eterozigoti attesa in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nel caso generale di  $k$  alleli:  $H_e = (1 - \sum p_i^2)$ . L'eterozigosi attesa media è la media delle eterozigosi attese per ciascuno dei vari loci.
- ricchezza allelica,  $A_{(g)}$ , è il numero di alleli atteso in un campione di dimensioni  $g$ . Questo parametro è utile per confrontare il numero di alleli presente in campioni di dimensioni differenti.
- indice di fissazione ( $F_{IS}$ ), misura deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, come un *eccesso* o un *difetto* di omozigoti (o di eterozigoti) rispetto all'atteso.  $F_{IS}$  assume valori *positivi* in caso di *eccesso di omozigoti*, mentre assume valori *negativi* in caso di *difetto di omozigoti*.  $F_{IS}$  misura l'eventuale eccesso o difetto di omozigoti all'interno delle sottopopolazioni che ha cause specifiche interne alle sottopopolazioni (es: inincrocio).
- $F_{ST}$  (NEI, 1972), un indice del grado di differenziamento («distanza genetica») presente fra le popolazioni. Rappresenta la percentuale di variabilità genetica attribuibile alla componente *tra* popolazioni.

Infine, è stata quantificata la distanza genetica tra le popolazioni mediante la distanza genetica di Nei.

## RISULTATI

In totale sono stati analizzati 750 individui. L'efficienza d'amplificazione (percentuale di amplificazioni con esito positivo) dei marcatori varia tra il 93% ed il 99%: i marcatori con efficienza inferiore sono *MFC5* (93%) e *Quru-GA-0A01* (95%), mentre i marcatori sviluppati in *F.sylvatica* mostrano un'efficienza maggiore (vedi tabella 2). Il confronto tra le rese dei marcatori sviluppati in *F. sylvatica* e in altre specie, non è però significativo. Il numero medio di dati mancanti per marcatore per popolazione varia tra 2.04 per *MFC5* e 0.24 per *Fs1-15*.

Tabella 2 – Per ogni locus è stato riportato il numero totale di individui analizzati, il numero di individui effettivamente caratterizzati, il numero di amplificazioni non riuscite e quindi la resa del marcatore in termini di percentuale di amplificazioni riuscite.

– For each locus the total number of sampled individuals, number of individuals genotyped, number of failed PCR amplifications, and percentage of successful amplifications.

LOCUS	N. totale individui	N. individui caratterizzati	N. amplificazioni non riuscite	Resa del marcatore (%)
<i>Fs1-11</i>	750	727	23	97
<i>Fs1-15</i>	750	744	6	99
<i>Fs4-46</i>	750	722	28	96
<i>MFC5</i>	750	699	51	93
<i>Quru-GA-0A01</i>	750	714	36	95

Il numero di alleli per locus nel totale dei 750 individui varia tra 19 (*Quru-GA-0A01* e *Fs1-15*) e 50 (*Fs4-46*) mentre il numero medio di alleli per locus entro popolazione è pari a 10.7.

Per il locus *Fs1-11* sono stati ritrovati in totale 21 varianti alleliche. Il numero di alleli per popolazione varia tra 5 (Libbiano) e 12 (Boccheggiano) con una media di 9 alleli per popolazione. Le dimensioni degli alleli sono comprese nell'intervallo 95-137 paia basi (pb) e gli alleli più frequenti sono l'allele 115 e 113. L'eterozigosi attesa varia tra 0.43 e 0.83 (per Monte Venere e Sarteano), mentre l'eterozigosi osservata varia tra 0.26 e 0.79 (Aquerino Nord e Monte Cimino). Il locus *Fs1-11* presenta i valori più bassi osservati in questo studio per l'eterozigosi attesa ed osservata totali: rispettivamente 0.77 e 0.72. Per 15 popolazioni su 25 il parametro  $F_{IS}$  indica la presenza di un significativo eccesso di omozigoti.

Il microsatellite *Fs1-15* presenta il numero totale di alleli minore: 19. Il numero di alleli per popolazione varia tra 7 (Monte Amiata, Monte Cimino, Monte Venere) e 12 (Aquerino Sud e Monte Alto) con una media di 9 alleli per popolazione. Le dimensioni degli alleli sono comprese nell'intervallo

92-131 paia basi. Gli alleli più frequenti sono il 110 (nella popolazione dell'Alpe di Catenaia ha una frequenza pari al 50%), il 112 ed il 118. L'eterozigosi attesa varia tra 0.71 (Alpe di Catenaia) e 0.85 (Borro Formicciolo), mentre l'eterozigosi osservata varia tra 0.33 (Quattrostrate) e 0.9 (Montieri e Settefonti). I valori di eterozigosi attesa ed osservata totali per questo microsatellite sono di 0.86 e 0.80. Per undici popolazioni delle 25 analizzate i valori di  $F_{IS}$  sono significativamente diversi da zero ed evidenziano in tutti i casi un eccesso di omozigoti.

Il marcatore *Fs4-46* presenta il numero totale di alleli più alto (50). Il numero di alleli per popolazione varia tra 7 (Monte Giovi) e 19 (Settefonti) con un valore medio di 13. La dimensione degli alleli spazia tra 204-432 pb. L'allele più frequente in generale è il 237; considerando invece la suddivisione nei tre gruppi di popolazioni il 237 è l'allele più frequente per le Marginali, mentre è il secondo più frequente negli altri due gruppi. Nelle Caciali l'allele più frequente è il 264, mentre per le Abissali è il 273. L'eterozigosi attesa varia tra 0.69 e 0.81 (Monte Giovi e Settefonti). L'eterozigosi osservata varia tra 0.40 (Libbiano) e 0.9 (Montieri). Le eterozigosi attesa ed osservata totali per *Fs4-46* sono di 0.90 e 0.84 rispettivamente. In 18 popolazioni è stato evidenziato un significativo eccesso di omozigoti.

Il microsatellite *MFC5* presenta un totale di 35 alleli. Le dimensioni degli alleli sono comprese tra 208 pb e 323 pb, mentre l'allele più frequente è il 304. Il numero di alleli per popolazione varia tra 8 (Borro Formicciolo) e 18 (Viamaggio) con una media di 13. L'eterozigosi attesa varia tra 0.76 (di Borro Formicciolo) e 0.91 (Aquerino Nord e Viamaggio), mentre l'eterozigosi osservata varia tra 0.38 (Allumiere) e 0.91 (Bracciano). L'eterozigosi attesa ed osservata totali sono di 0.93 e 0.86. In 18 delle 25 popolazioni analizzate l' $F_{IS}$  registra la presenza di un significativo eccesso di omozigoti.

Il microsatellite *Quru-GA-0A01* presenta in totale 19 alleli mentre il numero di alleli per popolazione varia tra 6 (Miemo e Settefonti) e 12 (Monte Pennino, Monte Venere e Sarteano). Il numero medio di alleli per popolazione è 9. L'allele più frequente è il 101 e le dimensioni degli alleli sono comprese nell'intervallo 80-119 pb. L'eterozigosi attesa varia tra 0.59 e 0.87 (Forro Anciolina e Monte Pennino). L'eterozigosi osservata varia, tra 0.56 (Forro Anciolina) e 1 (Quattrostrate). L'eterozigosi attesa ed osservata totali sono rispettivamente 0.85 e 0.80. Per questo marcatore le popolazioni con valori di  $F_{IS}$  significativamente maggiori di zero sono 8, il numero più basso per marcatore osservato finora.

Per i parametri appena descritti (numero alleli, eterozigosi attesa ed osservata, indice di fissazione) e per la ricchezza allelica l'analisi della varianza non evidenzia differenze significative tra i tre gruppi di popolazioni tranne per il parametro ricchezza allelica al locus *MFC5* (tabella 3, figura 2).

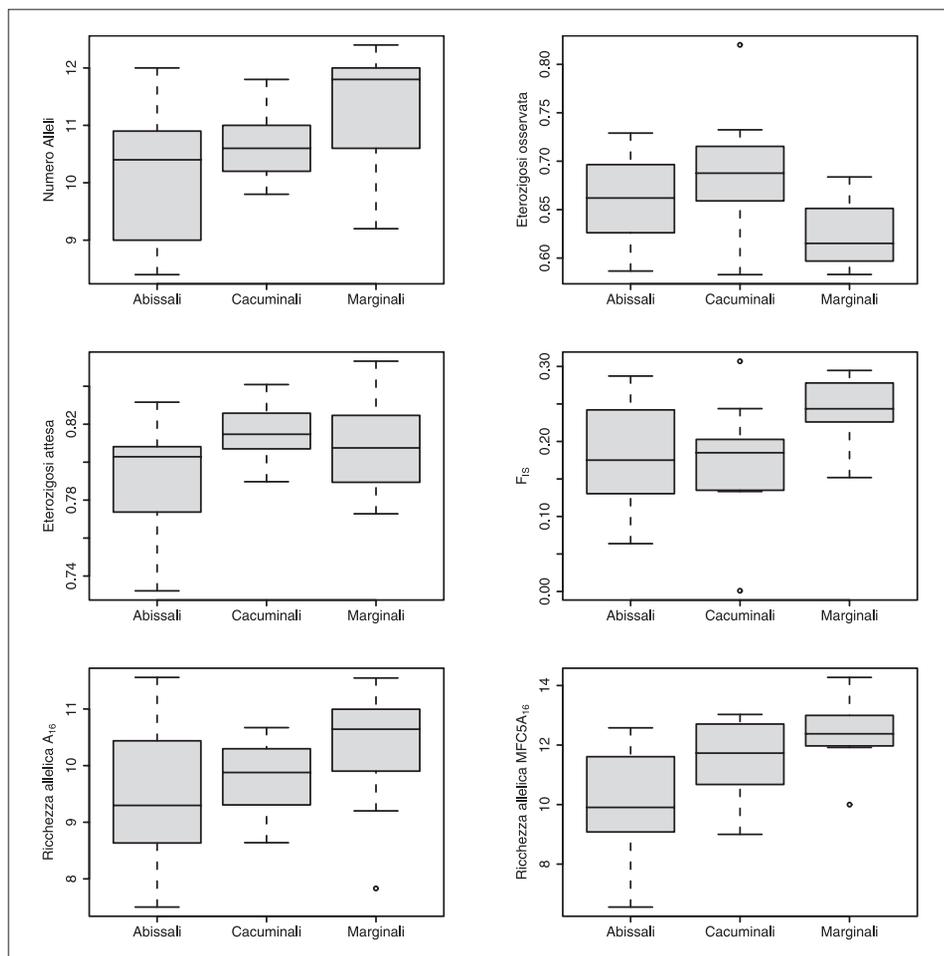


Figura 2 – Boxplot dei parametri (mediana, quartile, range) per numero di alleli, eterozigosi attesa ed osservata,  $F_{IS}$ , Allelic Richness totale e Allelic Richness per il marcatore MFC5 divisi nei tre gruppi di popolazioni (popolazioni Abissali, Cacuminali e Marginali).

– Boxplot of parameters values (median, quartile, range) for the number of alleles, expected and observed heterozygosity,  $F_{IS}$ , total Allelic Richness and Allelic Richness for locus MFC5 for each group of populations.

La ripartizione della variabilità genetica nelle componenti *entro* popolazione, *tra* popolazioni e *tra gruppi* mediante l'analisi della varianza molecolare (AMOVA, MICHALAKIS e EXCOFFIER, 1996) rivela come il 96% della variabilità sia attribuibile alla componente *entro* popolazione e il 4% alla componente *tra* popolazioni, nessuna porzione significativa di variabilità è stata attribuita alla componente *tra gruppi*.

Il valore del parametro  $F_{ST}$  mediato su tutte le popolazioni è pari a 0.066, quindi attribuisce una porzione pari allo 0.66% della variabilità alla

Tabella 3 – Riporta i risultati dell'analisi della varianza tra gruppi di popolazioni (popolazioni Abissali, Cacuminali e Marginali).effettuata sul valore medio fra i loci dei parametri per ogni popolazione. Per ogni ANOVA è riportato il numero gradi di libertà (df), il valore di  $F$  e la probabilità di ottenerlo ( $P$ ).

– *Analysis of variance among groups of populations (Near-Marginal, Remote-Summit and Remote-Abyssal) computed on parameters averaged over loci for each population. Degrees of freedom, F value and P are reported.*

Parametro	df	F	P
Numero medio alleli	2,22	2.08	0.15
Eterozigosi osservata	2,22	2.87	0.08
Eterozigosi attesa	2,22	2.15	0.14
$F_{IS}$	2,22	2.21	0.13
Ricchezza allelica $_{(g=16)}$	2,22	0.93	0.40
Ricchezza allelica al locus $MFC5_{(g=16)}$	2,22	4.46	0.02

componente *tra* popolazioni. Interessante è la significatività statistica della componente tra gruppi nonostante il suo basso valore in termini assoluti (0.5% del totale). Confrontando i valori di  $F_{ST}$  calcolati entro ciascun gruppo di popolazioni (Abissali,  $F_{SG}^A$ , Cacuminali,  $F_{SG}^C$  e Marginali,  $F_{SG}^M$ ) con un intervallo di confidenza del 95% stimato mediante 1000 cicli di ricampionamento (bootstrap) è emerso come il gruppo delle popolazioni Abissali evidenzi un grado di differenziamento significativamente maggiore ( $F_{SG}^A=0.070$ ,  $CI=0.065-0.077$ ) rispetto alle popolazioni Cacuminali ( $F_{SG}^C=0.038$ ,  $CI=0.024-0.051$ ) e Marginali ( $F_{SG}^M=0.039$ ,  $CI=0.031-0.049$ ).

Infine è stata effettuata un'analisi delle coordinate principali sulle distanze genetiche presenti tra le popolazioni. Il grafico risultante da quest'analisi rappresenta la distribuzione delle popolazioni (in base alle distanze genetiche tra le stesse) in un sistema di due coordinate che spiegano rispettivamente il 18.12% ed 13.29% della variabilità totale. Sul grafico le popolazioni si distribuiscono approssimativamente in cerchi concentrici: con le popolazioni Marginali al centro, le Cacuminali un po' più esterne e le Abissali ancora più esterne e disperse nel grafico (vedi figura 3).

## DISCUSSIONE

I microsatelliti sono marcatori sitospecifici, con una buona riproducibilità, neutrali, cioè non soggetti alla pressione della selezione, e altamente variabili. Hanno un tasso di mutazione per generazione di circa  $10^{-3}-10^{-4}$  (WEISSENBACH *et al.*, 1992). Queste caratteristiche rendono il microsatellite il marcatore ideale per gli studi di genetica della conservazione, in partico-

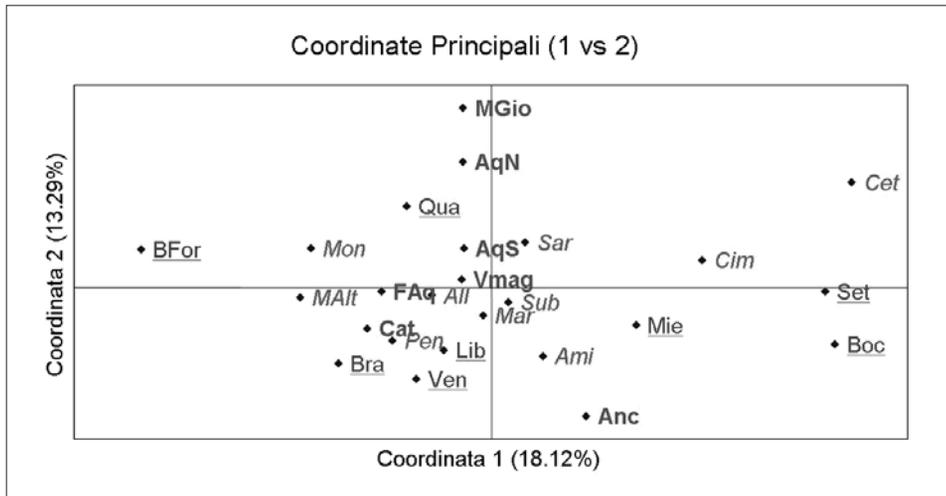


Figura 3 – Grafico delle coordinate principali calcolate sulle distanze genetiche di Nei a coppie. La sigla delle popolazioni è riportata con stili differenti a seconda del gruppo di appartenenza: in **grassetto** le Marginali, *corsivo* le Cacuminali e sottolineate le Abissali.

– Plot of principal coordinate computed on pairwise Nei genetic distances. Labels of populations are written in different style according to the group: underlined for Remote-Abyssal, italic for Remote-Summit and **bold** for Near-Marginal.

lare se si vogliono misurare gli effetti di deriva genetica e migrazione sulla variabilità genetica delle popolazioni (SCOTTI *et al.*, 1999).

Tutti i microsatelliti utilizzati sono stati posizionati in una mappa genetica costruita per il faggio in differenti gruppi d'associazione (SCALFI *et al.*, 2004), questo permette di considerare che la loro trasmissione dai genitori ai figli avvenga in maniera indipendente e che il campionamento del genoma sia omogeneo.

Inoltre i microsatelliti utilizzati in questo studio non presentano associazioni strette con i tratti adattativi. Il microsatellite *Fs4-46* si trova a 17 cM da un marcatore associato al tratto «area fogliare» (SCALFI *et al.*, 2004). L'associazione di un marcatore con un tratto adattativo, fortemente soggetto alle pressioni della selezione, potrebbe determinare un'azione della selezione sul marcatore stesso. In questo modo il marcatore smetterebbe di riflettere unicamente gli effetti di deriva genetica e flusso genico, quindi non potrebbe essere utilizzato per misurare gli effetti della frammentazione sulle popolazioni (LECORRE e KREMER, 2003). La distanza del microsatellite *Fs4-46* dal locus associato al tratto quantitativo e la rapida decadenza del *linkage disequilibrium* per le piante forestali (NEALE e SAVOLAINEN, 2004) lasciano comunque supporre che il marcatore possa essere considerato come selettivamente neutrale.

I cinque loci microsatellite hanno mostrato un'elevata variabilità all'interno delle popolazioni analizzate con un numero medio di alleli per popolazione che varia tra 8.6 e 13.4 con una media di 10.7 alleli per popolazione. Per i quattro microsatelliti sviluppati e/o ottimizzati in *F. sylvatica* PASTORELLI *et al.* (2003), analizzando 70 individui, ritrovano un numero di alleli compreso tra 10 e 18, e valori di eterozigosi attesi ed osservati simili a quelli ottenuti in questo lavoro. BUIVEVELD *et al.* (2003, submitted) in uno studio volto ad identificare la presenza di differenze nella variabilità genetica di popolazioni naturali e gestite di *F. sylvatica*, utilizzano i marcatori *Fs4-46*, *Fs1-15* e *MFC5* individuando per questi loci un numero di alleli per stand compreso tra 9-23.

Per il microsatellite sviluppato in *Quercus rubra* (*Quru-GA-0A01*) i dati riportati in questo studio sono i primi relativi alla sua variabilità in popolazioni di *F. sylvatica*. I dati riportati in letteratura sono riferiti a *Q. rubra* e riportano un valore di eterozigosi atteso simile (0.78) (ALDRICH *et al.*, 2002) o inferiore (0.569) (ALDRICH *et al.*, 2003) a quelli ritrovati da noi (0.786).

L'elevata variabilità dei loci microsatellite ritrovata nelle popolazioni di faggio analizzate in questo studio è in linea con i risultati ottenuti per altre specie forestali. COTTRELL *et al.* (2003), confrontando la variabilità genetica presente tra due regioni per due specie di quercia, ritrovano un numero di alleli variabile tra 9 e 16 e tra 17 e 34 rispettivamente in 25 e 214 individui di *Q. petraea*, e tra 15 e 28, e 12 e 31 in rispettivamente 58 e 387 individui di *Q. robur*; i valori di eterozigosi attesi calcolati spaziano tra 0.81 e 0.95. In 7 popolazioni frammentate di *Swietenia macrophylla* analizzate mediante 8 loci microsatellite, LEMES *et al.* (2003) ritrovano un numero di alleli medio per popolazione di 9.5, mentre i valori di eterozigosi attesi variano tra 0.754-0.812 con media di 0.781. Nella stessa specie, uno studio di NOVICK *et al.* (2003) con 7 loci SSR individua un valore di eterozigosi medio di 0.657 (range=0.593-0.799) e un range per il numero di alleli compreso tra 6.43-8.86. Sempre in popolazioni di *Swietenia macrophylla* analizzate a 5 loci SSR, CESPEDES *et al.* (2003) ritrovano un numero di alleli medio per popolazione di 2.8-4 e valori di eterozigosi attesi tra 0.47-0.54.

Tutti i microsatelliti hanno presentato in almeno un terzo delle popolazioni analizzate un eccesso di omozigoti rispetto all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Altri studi effettuati sul faggio con microsatelliti od isozimi hanno evidenziato un eccesso di omozigoti rispetto all'atteso secondo Hardy-Weinberg (BUIVEVELD *et al.*, 2003; BUIVEVELD *et al.*, submitted; COMPS *et al.*, 1990; LEONARDI e MENOZZI, 1995). Una possibile spiegazione della presenza di un eccesso di omozigoti riscontrato nelle popolazioni di

*F. sylvatica* deriva secondo alcuni autori dalla presenza di una struttura microspaziale non casuale prodotta dall'incrocio tra individui vicini (COUGEN *et al.*, 1988; COMPS *et al.*, 1990). Un'altra spiegazione fornita è la presenza di alleli nulli ai loci (VORNAM *et al.*, 2004). Per il microsatellite *Fs4-46* è stato individuato un allele nullo nella progenie di un incrocio controllato (PASTORELLI *et al.*, 2003). La presenza di un eccesso di omozigoti a tutti i loci analizzati fa comunque pensare che le ragioni siano da ricercare nelle caratteristiche riproduttive di questa specie.

Tranne che per la ricchezza allelica relativa al locus *MFC5*, non è stata rilevata alcuna differenza nei parametri di variabilità interna alle popolazioni tra i tre gradi di frammentazione considerati. Differenze significative sono state riscontrate, invece, per quanto riguarda il grado di differenziamento dei tre gruppi di popolazioni. Le popolazioni Abissali, più frammentate, evidenziano un maggior differenziamento al loro interno ( $F_{SG}^A=0.070$ ,  $CI=0.065-0.077$ ) rispetto alle popolazioni cacuminali ed abissali ( $F_{SG}^C=0.038$ ,  $CI=0.024-0.051$  e  $F_{SG}^M=0.039$ ,  $CI=0.031-0.049$ ). Questo risultato può essere interpretato come conseguenza di un ridotto flusso genico e di un maggior effetto della deriva genetica sulle popolazioni Abissali.

Uno studio effettuato mediante marcatori isoenzimatici, sulle stesse popolazioni di faggio analizzate in questo lavoro, ha mostrato gli stessi risultati: non sono state riscontrate differenze tra i tre gruppi di popolazioni se non a livello del grado di differenziamento (LEONARDI *et al.*, in prep).

Anche LEMENS *et al.* (2003) ritrovano un risultato simile in 7 popolazioni frammentate di *Swietenia macrophylla*. La variabilità interna alle popolazioni, misurata mediante 8 loci microsatellite, è risultata molto elevata ed un effetto della frammentazione è stato evidenziato unicamente come significativo differenziamento delle popolazioni. BACLES *et al.* (2004), in uno studio effettuato in *Sorbus aucuparia* mediante marcatori del cpDNA e isozimi, ritrovano in 8 popolazioni scozzesi frammentate una variabilità elevata ( $H_E=0.195$  per gli isozimi e  $H_E=0.490$  per il cpDNA) e comparabile a quella ritrovata nelle popolazioni europee non frammentate. D'altra parte le popolazioni analizzate da BACLES *et al.* (2004) hanno evidenziato un significativo grado di differenziamento.

In conclusione da questo studio emerge come la forte frammentazione delle popolazioni analizzate abbia determinato delle leggere ma significative modifiche della struttura genetica delle stesse evidenziabili solo dopo accurate analisi. Emerge in particolare un ruolo importante del parametro  $F_{SG}$  che è risultato l'unico in grado di evidenziare delle differenze tra i tre livelli di frammentazione analizzati.

Il fatto di evidenziare una differenza tra questi livelli di frammentazione unicamente a livello dell' $F_{SG}$ , potrebbe indicare che l'evento di frammentazione è ancora troppo recente per avere delle conseguenze sulla variabilità interna delle popolazioni.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. R. Giannini (CNR Firenze) per l'aiuto fornito nell'individuazione delle popolazioni analizzate.

#### SUMMARY

##### Fragmentation effects on beech genetic structure

An objective of an ecologically sustainable forest management is the conservation of genetic variability. Genetic variability is required for species to survive and reproduce in the array of conditions they face. The conservation of genetic variability is a pre-condition for the future evolution and adaptability of local populations and species. To understand the impact of forest management on genetic diversity is necessary to define the number of individuals that exchange genes, the area they cover and in turn which is the smallest level of habitat fragmentation that has an effect on genetic diversity.

For this purpose we studied 25 beech population (*Fagus sylvatica* L.) from Central Italy selected to represent three increasing level of fragmentation: near-marginal populations, remote-summit populations, remote-abyssal populations. Thirty plants per population were sampled and local coordinates were recorded for each plant. Individuals were characterized with 5 SSR markers.

Analysis of variance on the number of alleles, on  $F_{IS}$ , observed and expected heterozygosity shows that the three groups (Near-Marginal, Remote-Summit and Remote-Abyssal) do not differ.

By  $F$ -statistic analysis performed on genetic data, we found a significant higher  $F_{SG}$  value among near-abyssal populations. Principal coordinates analysis performed on the pair-wise genetic matrix confirms previous result: remote-abyssal populations do not appear in a unique clear cluster and are widespread in the plot. Remote-summit population and near-marginal populations are less spread out and are mostly found around the center of the plot.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALDRICH P., PARKER G.R., MICHLER C.H., ROMERO-SEVERSON J., 2003 – *Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest.*- Canadian Journal of forest Research, 33 (11): 2228-2237.
- ALDRICH P., MICHLER C., SUN W., ROMERO-SEVERSON J., 2002 – *Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: Quercus rubra).* Molecular Ecology Notes, 2: 472-474.

- BACLES C.F.E., LOWE A.J., ENNOS R.A., 2004 – *Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of Sorbus aucuparia in a deforested Scottish landscape*. *Molecular Ecology*, 13: 573-584.
- BUITEVELD J., VENDRAMIN G., GEBUREK T., 2003 – *Genetic diversity*. In: Dynabeech final report: Effect of silvicultural regimes on dynamics and genetic and ecological diversity of European beech forest. Academic Press.
- BUITEVELD J., VENDRAMIN G., LEONARDI S., GEBUREK T., 2005 – *Genetic diversity and differentiation in ten European beech (Fagus sylvatica L.) stands differing in management history* - submitted.
- CESPEDES M., GUTIERREZ M.V., HOLBROOK N.M., ROCHA O.J., 2003 – *Restoration of genetic diversity in the dry forest tree Swietenia macrophylla (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica* - *Molecular Ecology*; 12 (12): 3201-12.
- COMPS B., THIEBAUT B., PAULE L., MERZEAU D., LETOUZEY J., 1990 – *Allozymic variability in beechwoods (Fagus sylvatica L.) over central Europe: Spatial differentiation among and within populations*. *Heredity*, 65: 407-417.
- COTTRELL J.E., MUNRO R.C., TABBENER H.E., MILNER A.D., FORREST G.I., LOWE A.J., 2003 – *Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history*. *Forest Ecology and Management*, 173: 287-303.
- COUGUEN J., MERZEAU D., THIEBAUT B., 1988 – *Genetic structure of the European beech stands (Fagus sylvatica L.): F-statistic and importance of mating system characteristics in their evolution*. *Heredity*, 60: 91-100.
- CUNNINGHAM M., MORITZ C., 1998 – *Genetic effects of forest fragmentation on a rainforest restricted lizard (Scincidae: Gnypetoscincus queenslandiae)*. *Biological Conservation*, 83: 19-30.
- FORÈ S.A., HICKEY R.J., VANKAT J.L., GUTTMAN S.I., SCHAEFER R.L., 1992 – *Genetic-Structure After Forest Fragmentation - A Landscape Ecology Perspective On Acer-saccharum*. *Canadian Journal Of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 70 (8): 1659-1668.
- HARRISON S., HASTINGS A.M., 1996 – *Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure*. *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 180-183.
- HUTCHINSON D.W., TEMPLETON A.R., 1999 – *Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability*. *Evolution*, 53: 1898-1914.
- LANDE R., 1988 – *Genetics and demography in biological conservation*. *Science*, 241: 1455-1460.
- LE CORRE V., KREMER A., 2003 – *Dynamics of genetic variability at neutral markers, QTLs and adaptive traits in a subdivided population under stabilizing and diversifying selection*. *Genetics*, 164: 1205-1219.
- LEMENS M.R., GRIBEL R., PROCTOR J., GRATTAPAGLIA D., 2003 – *Population genetic structure of mahogany (Swietenia macrophylla King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implication for conservation*. *Molecular Ecology*, 12: 2875-2883.

- LEONARDI S., MENOZZI P., 1995 – *Genetic variability of Fagus sylvatica in Italy: the role of postglacial recolonization*. *Heredity*, 75:35-44.
- LEONARDI S., PIOVANI P., MENOZZI P., 2005 – *Effect of habitat fragmentation on genetic structure of some peripheral populations of beech in Italy*. In prep.
- MICHALAKIS Y., EXCOFFIER L., 1996 - *A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special interest to microsatellite loci*. *Genetics*, 142: 1061-1064.
- NEALE D., SAVOLAINEN O., 2004 – *Association genetics of complex traits in conifers*. *Trends in Plant Science*, 9: 325-330.
- NEI M., 1972 – *Genetic distance between populations*. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- NOVICK R.R., DICK C.W., LEMES M.R., NAVARRO C., CACCONE A., BERMINGHAM E., 2003 – *Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (Swietenia macrophylla) inferred from microsatellite analysis*. *Molecular Ecology*, 12 (11): 2885-93.
- PASTORELLI R., SMULDERS M., VAN'T WESTENDE W., VOSMAN B., GIANNINI R., VETTORI C., VENDRAMIN G., 2003 – *Characterisation of Microsatellite Markers in Fagus sylvatica L. and Fagus orientalis Lipsky*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 76-78.
- SAUNDERS D., HOBBS R., MARGULES C., 1991 – *Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review*. *Conservation Biology*, 5:18-32.
- SCALFI M., TROGGIO M., PIOVANI P., LEONARDI S., MAGNASCHI G., VENDRAMIN G., MENOZZI P., 2004 – *A RAPD AFLP and SSR linkage map and QTL analysis in European beech (Fagus sylvatica L.)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 433-441.
- SCOTTI I., PAGLIA G., MAGNI F., MORGANTE M., 1999 – *Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure*. In: Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. Gillet, E.M. (ed), Chapter 8.
- TANAKA K., TSUMURA Y., NAKAMURA T., 1999 – *Development and polymorphism of microsatellite markers for Fagus crenata and the closely related species F. japonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 11-15.
- VORNAM B., DECARLI N., GAILING O., 2004 – *Spatial distribution of genetic variation in a natural stand (Fagus sylvatica L.) based on microsatellite markers*. *Conservation Genetics*, 5: 561-570.
- WEISSENBACH J., GYAPAY G., DIB C., VIGNAL A., MILLASSEAU M.J.P., VAYSSIEX G., LATHROP M., 1992 – *A second-generation linkage map of the human genome*. *Nature*, 359: 794-801.
- YOUNG A., BOYLE T., BROWN T., 1996 – *The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants*. *Trend in Ecology and Evolution*, 11 (10): 413-418.