

Analisi della variabilità genetica in due popolazioni delle specie relitte *Abies alba* Miller (Pinaceae) e *Betula pendula* Roth (Betulaceae) del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano (Salerno)

PAOLA CENNAMO¹, RICCARDO DI NOVELLA², BRUNO MENALE³

¹Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223, I-80139 Napoli, Italia; ²Via Ischia, 61, I-84038 Sassano (SA), Italia; ³Orto Botanico, Facoltà di Scienze, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223, I-80139 Napoli, Italia.

Riassunto. Due popolazioni relitte di *Abies alba* e *Betula pendula* sono presenti sul monte Motola nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. Queste due specie sono presenti con pochissime popolazioni nell'Italia meridionale. È stato intrapreso uno studio sulla variabilità genetica di queste due entità mediante l'impiego di marcatori nucleari (ISSR). L'analisi molecolare ha evidenziato che le due popolazioni sono rappresentate da molteplici genotipi. Sulla base dei risultati ottenuti è quindi possibile ipotizzare che l'attuale struttura genetica delle popolazioni non ha risentito eccessivamente dell'impatto antropico in epoche storiche.

Abstract. Two relict populations of *Abies alba* and *Betula pendula* are present on monte Motola in Cilento and Vallo of Diano National Park. Nowadays, these two species are present only with few populations in southern Italy. An analysis of genetic variability of these two taxa has been carried out by employing nuclear molecular markers, namely ISSR. The molecular analysis revealed that the two examined populations are characterised by different and variable genotypes. Present results suggest the the actual genetic structure of examined populations has not been strong affected by human impact in the historic times.

Key words: *Abies*, *Betula*, Genetic variability, Relic populations

INTRODUZIONE

Parecchi generi della flora risalenti al Terziario (*Aesculus* L., *Cercis* L., *Hamelis* L., *Juglans* L., *Liquidambar* L., *Platanus* L., *Pterocarya* Kunth and *Zelkova* Spach) si sono estinti in Europa durante le glaciazioni del Quaternario. Le poche specie del Terziario che sono ancora presenti sono sopravvissute nei rifugi glaciali presenti in Europa meridionale (COMES *et al.*, 1998; FERRIS *et al.*, 1999).

Inoltre, nel Mediterraneo la pressione antropica sull'ambiente è stata particolarmente incisiva durante gli ultimi millenni,

basti considerare il destino che hanno subito le specie forestali, sfruttate e decimate da parte dell'uomo durante il processo di civilizzazione e industrializzazione.

Oggi, per cercare di riparare ai danni causati dall'azione antropica, molte ricerche sono state svolte per salvaguardare la flora autoctona. Partendo da questi studi si è giunti alla conclusione che le informazioni circa la diversità genetica di una popolazione possono essere di fondamentale importanza per poter impostare un concreto programma di conservazione.

Per poter studiare la diversità genetica nelle popolazioni naturali si sono sviluppa-

te negli ultimi decenni diverse tecniche molecolari che hanno reso molto semplice lo studio e la comparazione dei flussi genici (O'HANLON *et al.*, 2000). Infatti, le specie che presentano piccoli areali presentano spesso bassi livelli di diversità genetica a causa della deriva genica e del ristretto flusso genico tra le popolazioni. Un buon potenziale di diversità genetica rappresenta un prerequisito fondamentale per la sopravvivenza di specie a carattere relictuale; l'assenza di variabilità genetica può infatti fortemente ridurre l'adattabilità delle popolazioni durante i cambiamenti ambientali (ELLSTRAND & ROOSE, 1987).

Due importanti specie arboree risalenti al Terziario che presentano un areale frammentato in Europa sono *Abies alba* Miller (abete bianco) e *Betula pendula* Roth (betulla) (TUTIN *et al.*, 1993). Tra le stazioni italiane più meridionali di queste due specie rivestono interesse quelle presenti sul Monte Motola (Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, Salerno).

Il genere *Abies* Miller è costituito da forme arboree con circa 40 specie con ampia distribuzione (America settentrionale e centrale, Africa, Europa ed Eurasia). Invece, il genere *Betula* L. comprende sia alberi che cespugli (circa 50 specie) con un areale che comprende solamente l'emisfero boreale.

Dopo il periodo delle glaciazioni, i due generi hanno avuto modelli di colonizzazione differenti; secondo KONNERT & BERGMANN (1995), *Abies alba* è presente in regioni montane nell'Europa meridionale. La distribuzione geografica della frequenza allelica dei loci isoenzimatici ha indicato cinque rifugi durante l'ultima glaciazione. La maggior parte delle popolazioni si sono originate preferenzialmente da due rifugi (Balcani e Italia centrale); un altro ipotetico rifugio che ha contribuito

all'espandersi di questa specie è presente in Francia meridionale. Altri due addizionali rifugi, però rimasti isolati fino ad oggi, corrispondono a quelli dei M. Pirenei e dell'Italia meridionale.

Invece, secondo i dati pubblicati da FERRIS *et al.* (1999), il genere *Betula* è un complesso di specie adattate a climi più freddi; quindi durante il periodo glaciale, queste entità non hanno subito restrizione dei loro areali geografici (HUNTLEY & BIRKS, 1983). La comparazione di marcatori plastidiali e nucleari, in molte specie di betulle europee, tra cui anche *B. pendula*, ha mostrato una bassissima variabilità genetica (FERRIS, lavoro in corso); questo risultato si è dimostrato inatteso ma molto interessante da parte dei ricercatori.

Lo scopo di questo lavoro è l'analisi della distribuzione della diversità genetica all'interno di due popolazioni meridionali del genere *Abies* e *Betula* usando marcatori molecolari, noti come ISSR (Semplici Sequenze Ripetute Interne).

I marcatori ISSR sono corte sequenze ripetute in tandem che si trovano all'interno di regioni microsatellitari del genoma nucleare. Essi sono considerati loci polimorfici, poiché presentano alta variabilità nel numero e nella lunghezza delle ripetizioni (O'HANLON *et al.*, 2000). La tecnica si avvale dell'utilizzo di una serie di primer, i quali amplificano in maniera random tratti di sequenze genomiche tra due regioni microsatellitari, al fine di identificare tali polimorfismi.

MATERIALI E METODI

Si è raccolto tessuto fogliare da 23 individui di *A. alba* e da 24 individui di *B. pendula* presenti sul M. Motola (Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano,

Tab. 1 - Sequenze, temperature di appaiamento e codifica dei primer impiegati nell'analisi degli ISSR nei popolamenti di *Abies alba* e *Betula pendula*.

Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)
<i>(Abies alba)</i>		
CHR	5' - CAC ACA CAC ACA CAY G - 3'	50
1	5' -CAC ACA CAC ACA CAC AAG - 3	53
2	5' - CAC ACA CAC ACA CAC AGG - 3'	55
<i>(Betula pendula)</i>		
8081	5' - GAG AGA GAG AGA GAG AGA C - 3'	58
DAT	5' - GAG AGA GAG AGA GAR C - 3'	50
TE	5' - GTG GTG GTG GTG RC - 3'	50,5

Salerno).

Il DNA genomico di ogni individuo è stato estratto mediante il QIAGEN Dnaesy Plant kit.

I primer ISSR utilizzati per le popolazioni di *A. alba* e *B. pendula* sono riportati in Tab. 1. In questa sono elencati i nomi dei primer, la sequenza di basi che li caratterizza e le temperature di annealing utilizzate nei cicli di amplificazione con la PCR.

I singoli primer sono stati prescelti in un esperimento preliminare condotto su 10 individui. Per ogni primer è stato quindi messo a punto il profilo di amplificazione e le condizioni di PCR. Questo passaggio ha permesso una messa a punto ottimale dell'amplificazione di ogni primer in base alle sue caratteristiche.

La reazione di amplificazione (PCR) è stata eseguita utilizzando un termocicizzatore Perkin Elmer 9600 (Applied Biosystem). Il volume finale della reazione è stato di 25*1 con 20 ng di template (DNA), 2.5 *1 tampone 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 9; 1% Triton X-100; 25 mM MgCl₂), 0.5 *M ISSR primer, 0.25

mM di ogni nucleotide e 1 unità enzimatiche di Taq polymerase (Pharmacia Biosciences). Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 45 cicli, di cui ogni ciclo costituito da 30 sec di denaturazione a 94 °C, 45 sec di appaiamento a 50 °C e 2 min di estensione a 72 °C. Le reazioni sono state denaturate inizialmente per 5 min a 94 °C; alla fine dell'ultimo ciclo l'estensione è stata aumentata di 7 min.

I frammenti amplificati sono stati fatti correre su un gel di agarosio al 2%. La lunghezza dei frammenti è stata stimata attraverso l'uso di un DNA ladder a 100 bp (Promega). La corsa elettroforetica ha avuto una durata di 16 ore ed è stata effettuata a basso voltaggio (circa 3 V/cm), in tampone TBE 1X. I frammenti amplificati sono stati colorati con bromuro d'etidio, visualizzati attraverso un transilluminatore a raggi ultravioletti (254 nm) e fotografati.

Dai profili elettroforetici dei frammenti amplificati sono state costruite matrici binarie in cui la presenza/assenza di un frammento di amplificazione è indicata

rispettivamente con 1 e con 0 per tutti i campioni esaminati. Tali matrici sono state quindi analizzate mediante l'utilizzo del software "SIN-TAX 2000 - Hierarchical Classification" (Podani, 2001), attraverso l'impiego di due algoritmi; per calcolare le distanze genetiche è stato usato il coefficiente di Jaccard ($1 - a/[a+b+c]$, dove a = numero di similarità positive tra due individui x e y , b = numero di bande presenti in x e assenti in y e c = numero di bande presenti in y ed assenti in x), per la costruzione di un albero di relazione tra i vari individui (dendrogramma) è stato usato il metodo UPGMA (media aritmetica) Cluster Analysis.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi degli ISSR ha rivelato che sia la popolazione di *A. alba* che quella di *B. pendula* presentano una notevole variabilità genetica. Infatti la popolazione di abete bianco ha mostrato 23 genotipi differenti su 25 individui analizzati (Fig. 1); invece, nella popolazione di betulla si sono ottenuti 24 genotipi differenti su 25 individui esaminati (Fig. 2).

I tre primer, usati nello studio del popolamento di *A. alba*, hanno prodotto 140 frammenti (di cui 110 variabili); nella popolazione di *B. pendula*, i tre primer impiegati hanno prodotto 160 frammenti, di cui 140 polimorfici.

Oggigiorno la conservazione della biodiversità è risultata essere uno degli impegni prioritari presi dalle comunità scientifiche internazionali in tema di salvaguardia ambientale. In questa situazione le specie particolarmente a rischio sono quelle il cui areale, per diversi motivi storici ed evolutivi, risulta essere molto ridotto o frammentato (YOUNG *et al.*, 1996). L'attuale

composizione e distribuzione della flora in Europa è il risultato dei fenomeni di migrazione iniziati al termine dell'ultimo evento glaciale. Gli interventi umani sull'ambiente hanno invece caratterizzato in modo incisivo le ultime migliaia di anni, soprattutto nel bacino del Mediterraneo. Lo sviluppo delle pratiche agricole, che hanno avuto origine nell'Oriente e sono state poi introdotte attraverso il Mediterraneo in tutta Europa, hanno causato la progressiva modificazione nella destinazione d'uso del territorio, sacrificando all'agricoltura i migliori terreni forestali. In tempi più recenti, i processi d'inurbamento hanno portato alla definitiva scomparsa di habitat di particolare significato per la biodiversità. Tuttavia alcuni relitti della precedente vegetazione sono sopravvissuti in situazioni di nicchia grazie alla presenza di particolari condizioni microambientali. Nella nostra penisola sono numerosi gli habitat di nicchia che rappresentano biotopi di particolari valori perché hanno preservato parte di una flora ormai quasi completamente estinta.

Il popolamento di *A. alba*, presente all'interno del territorio della comunità montana (Monte Motola), in base alla conoscenza della storia della flora e della loro attuale distribuzione, può essere per l'appunto definito relitto e pertanto meritevole di articolati ed approfonditi studi, finalizzati alla conservazione delle entità medesime e dei loro tipici habitat. Dai risultati ottenuti dalla presente analisi, si osservano alti livelli di variabilità genetica all'interno del popolamento confermando quindi la sua natura autoctona ed escludere l'ipotesi di trovarsi di fronte alla spontaneizzazione di una serie di individui impiantati dall'uomo in epoche storiche. Da quanto esposto e dai risultati ottenuti, il popolamento presente nel Monte Motola,

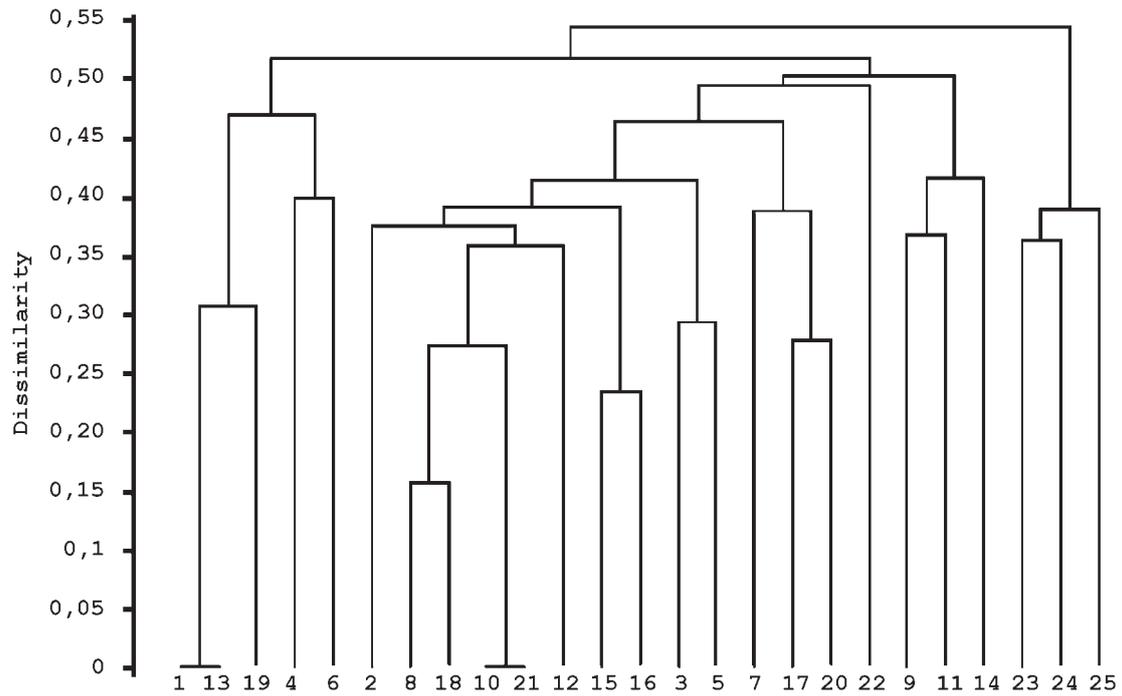


Fig. 1 - Dendrogramma (UPGMA) basato sul coefficiente di Jaccard per la popolazione di *Abies alba* (i singoli individui sono numerati da 1 a 25).

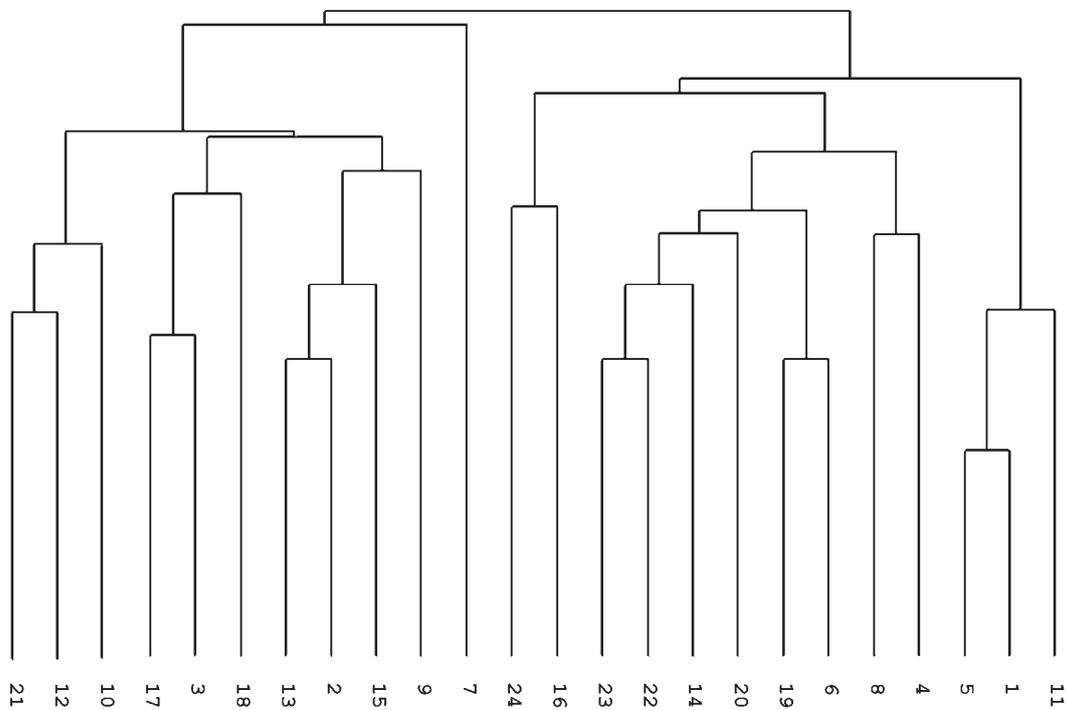


Fig. 2 - Dendrogramma (UPGMA) basato sul coefficiente di Jaccard per la popolazione di *Betula pendula* (i singoli individui sono numerati da 1 a 24).

pur avendo un carattere relittuale, presenta una natura autoctona ed un forte potenziale genico. Ciò può permettere di impostare un adeguato piano di conservazione nei confronti di questa specie, potenzialmente idonea a riappropriarsi degli ambienti limotrofi, non essendo sull'orlo dell'estinzione dal momento che ha conservato un buon potenziale genico. I potenziali rischi per la tutela di questa specie relitta sono i drastici cambiamenti climatici e la penetrazione del faggio e di altre forme vegetali.

Considerando, poi, i risultati dell'analisi eseguita sul popolamento di *B. pendula*, si evince anche in questo caso che i livelli di variabilità genetica sono relativamente alti confermando quindi la natura autoctona di questa popolazione; infatti, su ventiquattro esemplari campionati sono stati riscontrati ben ventiquattro genotipi differenti (Fig. 2). Tale popolamento ha indubbiamente natura relittuale nell'ambito dei popolamenti di betulla in Italia meridionale e con-

serva tuttora un alto grado di variabilità interna che indica l'esistenza di una potenzialità adattativa tuttora presente nel popolamento in esame.

In tale ottica, in presenza di modificazioni rapide dell'ambiente, la presenza di patrimoni genetici quanto più possibile differenti all'interno di una specie può costituire la differenza tra sopravvivenza ed estinzione (YOUNG *et al.*, 1996). Allo stesso tempo, il buon numero di genotipi individuati lascia presupporre un alto grado di diversità naturale che potrà sicuramente rappresentare un ottima base per il progetto di conservazione del suo germoplasma.

Ringraziamenti. Gli autori ringraziano la Comunità Montana per aver finanziato il progetto scientifico di ricerca sul popolamento di *Betula pendula* Roth (delibera n. 18 del 6/02/2001) e *Abies alba* Miller (delibera n. 40 del 26/03/2002).

LETTERATURA CITATA

- COMES H. P. & KADEREIT J. W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*, 3 (11): 432-438.
- ELLSTRAND, N.C. & ROOSE, M.L., 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74, 123-131.
- FERRIS C., KING R. A. & HEWITT G. M. 1999. Isolation within species and the history of glacial refugia. In: Hollingsworth P. M., Bateman R. M., Gornall R. J. (Eds.) *Molecular Systematic and plant evolution*. Pag. 20-34. Taylor & Francis, London.
- HUNTLEY B. & BIRKS H. J. B. 1983. *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13.000 years ago*. Cambridge, Cambridge University Press.
- KONNERT M. & BERGMANN F. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematic and Evolution*, 196: 19-30.
- O'HANLON P. C., PEAKALL R., BRIESE D. T. 2000. A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. *Weed Research*, 40: 239-254.
- PODANI J. 2001. *Syn-Tax 2000*. Computer program for data analysis in ecology and systematics. Scientia Publishing, Budapest.
- TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., MOORE, D. M., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M. & WEBB, D. A. (Eds.) 1993. *Flora Europaea*. University Press,

Cambridge.

YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T.
1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation in plants.

Trends in Ecology and Evolution, 11: 413-419.

Finito di stampare nell'ottobre 2003