

## PRIMA STIMA MEDIANTE MARCATORI SSR DELLA VARIAZIONE GENETICA TRA LE POPOLAZIONI DI *PINUS LARICIO* POIRET NEL LORO NATURALE AREALE DI DISTRIBUZIONE

Savino Bonavita<sup>1,4</sup>, Giovanni Giuseppe Vendramin<sup>2</sup>, Vincenzo Bernardini<sup>1</sup>  
Silvano Avolio<sup>3</sup>, Teresa Maria Rosaria Regina<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Unità di ricerca per la selvicoltura in ambiente mediterraneo (CRA-SAM), Arcavacata di Rende (CS); savino.bonavita@entecra.it

<sup>2</sup>Istituto di Bioscienze e Biorisorse - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBBR-CNR), Sesto Fiorentino (FI)

<sup>3</sup>Fondazione Selvicoltori Forestali della Calabria (SelviForCalabria), Cosenza (CS)

<sup>4</sup>Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra (DiBEST), Università della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

La diversità genetica fra le popolazioni di pino laricio (*Pinus laricio* Poiret) presenti nel loro areale naturale italiano di distribuzione (Calabria e Sicilia) è stata, per la prima volta, caratterizzata mediante l'impiego di marcatori molecolari SSR sia di tipo plastidiale sia nucleari. Entrambi i microsatelliti utilizzati si sono rivelati efficaci per la determinazione del grado di differenziamento genetico, della struttura e delle relazioni esistenti entro e tra le popolazioni. I risultati ottenuti da questo studio forniscono informazioni utili sulle più corrette strategie di gestione finalizzate, in particolare, alla conservazione e tutela di questa importante specie forestale.

*Parole chiave:* diversità genetica, struttura di popolazione, *Pinus laricio*, marcatori SSR, conservazione.

*Keywords:* genetic diversity, population structure, *Pinus laricio*, SSR markers, conservation.

<http://dx.doi.org/10.4129/2cis-sb-pri>

### 1. Introduzione

Il pino laricio (*Pinus laricio* Poiret) appartiene all'insieme collettivo dei pini neri (*Pinus nigra* Arnold). Il suo areale naturale italiano comprende la Calabria (Sila e Aspromonte), la Sicilia (versante settentrionale dell'Etna) e la Corsica (Avolio, 2003).

Le formazioni naturali di laricio occupano complessivamente 69.000 ettari (Avolio, 2003), distribuiti su quattro settori separati: 40.000 sulla Sila, 4000 sull'Aspromonte, 4000 sull'Etna e 21000 in Corsica. Sebbene rappresentino solo una piccola porzione dell'antica "*Silva brutia*" dei Romani, le pinete naturali di laricio calabresi e dell'Etna costituiscono popolamenti di elevato interesse forestale, fitogeografico, paesaggistico e ambientale.

Specie spiccatamente termofila, xerofila, eliofila, a rapido accrescimento e molto longeva (gli esemplari della Riserva Biogenetica di Fallistro in Sila, ad esempio, superano i 350 anni di vita, con dimensioni che vanno spesso oltre i 40 m in altezza e i 150 cm in diametro), il pino laricio forma prevalentemente boschi puri, distribuiti in un'ampia fascia altimetrica (900-1800 m s.l.m.), anche se, ai margini del suo areale naturale, può consociarsi ad altre specie forestali di pari fascia (querce caducifoglie in basso, faggi e abete bianco in alto) (Avolio, 2003). È noto che gli ecosistemi forestali forniscono benefici ecologici indiscutibili in termini di controllo del clima, fissazione di anidride carbonica, protezione idrogeologica, contrasto alla desertificazione, mantenimento della

biodiversità totale. Molti ambienti forestali naturali rischiano, tuttavia, di subire profonde ed irreversibili trasformazioni sia per la pressante azione antropica cui sono continuamente sottoposti (frammentazione, abbandono, sfruttamento non sostenibile delle risorse disponibili ecc.) sia a causa di uno scenario climatico oramai in continuo e rapido mutamento. Tutte le specie viventi, e le piante forestali in particolare, saranno in grado di far fronte a tali cambiamenti in virtù delle loro capacità di adattamento e, pertanto, della ricchezza ed ampiezza del loro patrimonio genetico (*gene pool*).

Attualmente, la stima della diversità genetica prevede il ricorso a tutta una serie di marcatori molecolari, considerati il più affidabile metodo di analisi della variabilità genetica, inter- e intra-specifica, di popolazioni naturali vegetali, che spesso si affianca ed integra le tecniche di caratterizzazione convenzionali.

Tra i diversi marcatori molecolari, i microsatelliti o SSR (*Simple Sequence Repeats*), nucleari (nu), plastidiali (cp) e/o mitocondriali (mt), hanno trovato largo impiego nello studio della diversità genetica di popolazioni naturali di diverse specie forestali, incluse quelle appartenenti al genere *Pinus* (Soranzo *et al.*, 1999; González-Martínez *et al.*, 2004). Del tutto irrilevanti sono stati gli studi sulla variabilità molecolare che hanno, finora, interessato *Pinus laricio*, nonostante tale specie rappresenti l'espressione simbolica del paesaggio forestale calabrese. Nel presente lavoro si riporta una sintesi dei risultati ottenuti dall'analisi delle caratteristiche genetiche condotta, per la prima volta, sulle popolazioni di pino

laricio, campionate nel loro areale naturale di distribuzione, attraverso l'applicazione di marcatori cpSSR e nuSSR.

L'obiettivo primario è quello di acquisire conoscenze adeguate relativamente alla struttura genetica delle popolazioni di laricio nel loro areale di origine, che si rivelano essenziali sia per l'attivazione di opportune strategie di conservazione e salvaguardia di tale emblematica specie forestale, sia per la scelta dei popolamenti più adatti per fornire il materiale di base da impiegarsi negli interventi di rimboschimento e di ripristino ambientale.

## 2. Materiale e Metodi

### 2.1 Materiale vegetale e siti di campionamento

Il lavoro di caratterizzazione genetica è stato svolto su 7 popolazioni di *Pinus laricio*, provenienti dalle Riserve naturali di Fallistro, Roncino, San Salvatore e Trenta Coste (Parco Nazionale della Sila), Maesano (Parco Nazionale dell'Aspromonte), Linguaglossa (Parco Regionale dell'Etna) e Restonica (Parco Naturale Regionale della Corsica) (Tab. 1).

In totale sono stati campionati 459 individui, scelti in maniera casuale e non contigui tra loro, di cui si è rilevata la posizione, mediante GPS, con precisione sub-metrica.

### 2.2 Estrazione del DNA ed analisi SSR

Il DNA genomico è stato isolato da aghi, prelevati da ogni esemplare di pino laricio, utilizzando il *Dneasy Plant Mini Kit* della *QIAGEN*, secondo il protocollo fornito dalla ditta stessa. Aliquote del materiale isolato erano, quindi, quantificate mediante analisi spettrofotometriche.

Per analizzare la variabilità genetica fra le popolazioni naturali di laricio sono state testate 5 coppie di *primer* plastidiali (cp) (Pt30204, Pt36480, Pt45002, Pt71936 e Pt87268), 3 nucleari (nu) (PtTX4001, PtTX3107 e SPAG7.14) ed una mitocondriale (mt) (Nad3-1), sviluppate e utilizzate con successo in altre specie del genere *Pinus* (Vendramin *et al.*, 1996; Soranzo *et al.*, 1999; Auckland *et al.*, 2002).

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando un termociclatore *96-well GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystem*). Il *primer forward* di ogni marcatore era marcato con un fluoroforo distinto per la visualizzazione tramite il sequenziatore capillare *ABI Prism 310* (*Applied Biosystem*).

L'analisi dello *scoring* del risultante *data set* è stata, infine, effettuata utilizzando il *software Genscan* (*Applied Biosystem*).

### 2.3 Analisi dei dati

I parametri di diversità genetica sono stati stimati utilizzando il software *GenAlex v.6* (Peakall e Smouse, 2006). La presenza di struttura genetica delle popolazioni è stata determinata mediante l'analisi delle coordinate principali (PCoA) ed il *software STRUCTURE* (Pritchard *et al.*, 2000).

## 3. Risultati

Dei nove *primer* microsattelliti utilizzati per amplificare, tramite PCR, il DNA genomico degli individui delle 7 popolazioni campionate (Tab. 1), ben 6 si sono rivelati polimorfici e, per tale motivo, sono stati impiegati per lo studio della variabilità genetica.

Nel caso specifico dei 3 cpSSR, Pt30204, Pt71936 e Pt87268, considerando tutti i 459 individui campionati, il numero di alleli per *locus* è risultato variare da un minimo di 6 (per il *locus* Pt71936) ad un massimo di 11 (per il *locus* Pt30204), per un totale di 27 varianti alleliche (Tab. 2). Le 27 varianti alleliche sono state combinate in 84 diversi aplotipi (h), di cui ben il 46% è risultato essere popolazione specifico (dati non mostrati). Livelli piuttosto elevati di diversità aplotipica (in media,  $H_e=0.92$ ) caratterizzano le popolazioni di laricio oggetto di studio, sebbene una lieve deplezione della variabilità genetica è stata osservata nella popolazione di Restonica ( $H_e= 0.84$ ) (Tab. 2).

L'analisi AMOVA, condotta per valutare il grado di differenziazione genetica sia intra- che inter-popolazione, ha messo in evidenza che la maggior parte della variabilità era da ricondurre a differenze tra individui entro le popolazioni, per un valore pari al 96.6%, mentre il 3.4% di variabilità è attribuibile alla presenza di differenze tra le popolazioni (dati non mostrati). Per stimare le relazioni genetiche tra le popolazioni oggetto di questo studio è stata, inoltre, eseguita un'analisi PCoA (Fig. 1), la quale ha messo in evidenza la separazione delle 7 popolazioni di laricio testate. In accordo con i valori delle distanze genetiche calcolati secondo Nei (1978), gli individui delle popolazioni di laricio della Sila sono risultati molto più vicini, dal punto di vista genetico, a quelli dell'Etna e della Corsica ma nettamente distanti dagli esemplari della popolazione dell'Aspromonte (Fig. 1).

Relativamente all'indagine condotta con i nuSSR, SPAG 7.14, PtTX3107 e PtTX4001 (Materiali e Metodi), tutti i *loci* utilizzati sono risultati polimorfici, rivelando un totale di 52 varianti alleliche nei 459 individui appartenenti alle 7 popolazioni di laricio analizzate. Il numero di alleli per *locus* è risultato variare da un minimo di 6 (*locus* PtTX3107) ad un massimo di 38 alleli (*locus* SPAG 7.14) (Tab.3). Dall'analisi dei parametri di diversità genetica per ciascuna popolazione è emerso che i valori medi dell'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) ed attesa ( $H_e$ ), in tutti i campioni analizzati, deviano dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (Tab. 3). Tale dato è stato confermato anche dai valori ottenuti dell'indice di fissazione (F) (Tab. 3). L'analisi del livello di differenziazione genetica (Fst) ha confermato che, analogamente all'indagine condotta con i cpSSR e con valori leggermente inferiori, soltanto il 2.1% della variabilità totale è da ascrivere a differenze fra le popolazioni, mentre la maggior parte della diversità (97.9%) è dovuta a differenze all'interno delle popolazioni (dati non mostrati).

Le relazioni tra le popolazioni campionate sono state investigate, infine, mediante il programma *STRUCTURE* (Pritchard *et al.*, 2000) (Fig. 2). Tale *software* implementa un algoritmo in grado di analizzare

la “struttura nascosta” di una popolazione senza utilizzare alcuna conoscenza *a priori* riguardo il numero di *cluster* (K, popolazioni) presenti nel *dataset*. Ciascun individuo sarà, dunque, assegnato ad una data popolazione, sulla base del genotipo posseduto e delle frequenze alleliche delle diverse popolazioni analizzate. Dall’analisi STRUCTURE è emerso che il valore ottimale di K è pari a 3 e che gli individui delle popolazioni di pino laricio campionati si separano in tre gruppi: nel primo si ritrovano gli individui a genotipo omogeneo della popolazione di Fallistro, nel secondo gli individui a genotipo misto delle rimanenti popolazioni della Sila, mentre nel terzo quelli delle popolazioni di Aspromonte, Etna e Corsica, a genotipo più omogeneo, formano un gruppo a parte (Fig. 2).

#### 4. Discussione e Conclusioni

Il presente lavoro rappresenta la prima dettagliata caratterizzazione genetica delle popolazioni di pino laricio, nel loro areale originario di distribuzione, mediante l’impiego della metodologia SSR. Entrambi i tipi di microsatelliti utilizzati, cpSSR e nuSSR, si sono rivelati efficaci nell’individuazione di un certo grado di differenziamento genetico esistente nelle e tra le popolazioni campionate.

L’utilizzo dei marcatori cpSSR, in particolare, ha evidenziato una ripartizione della varianza molecolare (AMOVA) del 3% tra le differenti popolazioni testate,

più bassa rispetto a quella ottenuta in studi analoghi condotti su altre specie del genere *Pinus* (Naydenov *et al.*, 2006).

Le indagini effettuate con i nuSSR hanno, di contro, rivelato un livello di differenziazione tra popolazioni inferiore rispetto a quello ottenuto con i cpSSR (2%). Questo dato sembrerebbe nel complesso dimostrare il maggior contributo del polline, rispetto al seme, al flusso genico delle popolazioni di pino laricio. I risultati ottenuti dall’analisi delle coordinate principali (PCoA), ed avvalorati dall’analisi STRUCTURE, hanno dimostrato per la prima volta la chiara strutturazione dei 7 popolamenti di laricio in tre gruppi principali, uno dei quali comprende la sola popolazione di Fallistro, ai molti conosciuta per la presenza al suo interno dei famosi “Giganti della Sila”, a conferma dell’importanza non solo paesaggistico e forestale ma da oggi anche genetica degli individui che la compongono.

Concludendo, è probabile che ulteriori analisi di *marcatori* differenti consentirebbe una stima molto più accurata della diversità genetica intraspecifica. I dati fin qui riportati, tuttavia, contribuiscono a migliorare il grado di conoscenza del *pool* genico delle popolazioni di pino laricio e rivestono una notevole valenza in campo forestale, in quanto forniscono informazioni utili per pianificare strategie di conservazione e salvaguardia di questa importante e finora inesplorata risorsa genetica del territorio.

Tabella 1. Caratteristiche principali dei siti di campionamento di *Pinus laricio* analizzati in questo studio.

Popolazione/Codice	N	Località montana	Latitudine (N)	Longitudine (E)	Altitudine (m a.s.l.)
Fallistro/FAL	108	Sila	39°19'	16°28'	1.410
Roncino/RON	60	Sila	39°04'	16°34'	1.200
S.Salvatore/SAL	60	Sila	39°22'	16°41'	1.300
Trenta Coste/TRE	60	Sila	39°29'	16°31'	1.350
Maesano/ASP	80	Aspromonte	38°06'	15°54'	1.410
Linguaglossa/ETN	80	Etna	37°48'	15°04'	1.430
Restonica/COR	11	Corsica	42°18'	9°07'	1.200

Tabella 2. Principali parametri di diversità genetica per i cpSSR (Na: numero di alleli per locus, Nh: numero di aplotipi, Nhp: numero di aplotipi privati, H<sub>cp</sub>: diversità genetica plastidiale).

Popolazione	Locus	Na	Nh	Nhp	H <sub>cp</sub>
FAL	Pt30204	8	25	6	0,91
	Pt71936	4			
	Pt87268	8			
RON	Pt30204	6	28	7	0,92
	Pt71936	5			
	Pt87268	7			
SAL	Pt30204	8	23	3	0,92
	Pt71936	4			
	Pt87268	6			
TRE	Pt30204	7	29	7	0,93

(Tabella 2. Continua)

	Pt71936	5			
	Pt87268	5			
ASP	Pt30204	8	33	8	0,95
	Pt71936	6			
	Pt87268	6			
ETN	Pt30204	7	34	8	0,95
<i>Popolazione</i>	<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>Nh</i>	<i>Nhp</i>	<i>Hcp</i>
	Pt71936	5			
	Pt87268	9			
COR	Pt30204	3	8	-	0,84
	Pt71936	3			
	Pt87268	4			
Media		5,9	25,7	39	0,92
SE		0,03	0,04	0,03	0,02

Tabella 3. Principali parametri di diversità genetica per i nuSSR (Na: numero di alleli per locus, Ho: eterozigosità osservata, He: eterozigosità attesa, F: indice di fissazione).

<i>Popolazione</i>	<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>
FAL	SPAG 7,14	29	0,81	0,89	0,085
	PtTX4001	6	0,45	0,71	0,364
	PtTX3107	5	0,23	0,28	0,177
	Tot	13,3	0,50	0,63	0,209
RON	SPAG 7,14	25	0,73	0,91	0,196
	PtTX4001	7	0,50	0,69	0,276
	PtTX3107	5	0,33	0,46	0,276
	Tot	12,3	0,52	0,69	0,249
SAL	SPAG 7,14	23	0,68	0,91	0,252
	PtTX4001	6	0,53	0,68	0,219
	PtTX3107	5	0,43	0,44	0,015
	Tot	11,3	0,55	0,68	0,162
TRE	SPAG 7,14	25	0,78	0,92	0,147
	PtTX4001	6	0,64	0,68	0,068
	PtTX3107	5	0,35	0,45	0,217
	Tot	12,0	0,59	0,68	0,144
ASP	SPAG 7,14	28	0,80	0,91	0,123
	PtTX4001	4	0,57	0,65	0,121
	PtTX3107	6	0,39	0,53	0,268
	Tot	12,67	0,58	0,70	0,171
ETN	SPAG 7,14	31	0,85	0,93	0,087
	PtTX4001	4	0,52	0,62	0,160
	PtTX3107	5	0,37	0,41	0,094
	Tot	13,3	0,58	0,66	0,114
COR	SPAG 7,14	10	0,27	0,89	0,696
	PtTX4001	3	0,18	0,43	0,577
	PtTX3107	3	0,64	0,57	-0,124
	Tot	5,3	0,36	0,63	0,383
Media		11,48	0,53	0,67	0,204
SE			0,04	0,04	0,04

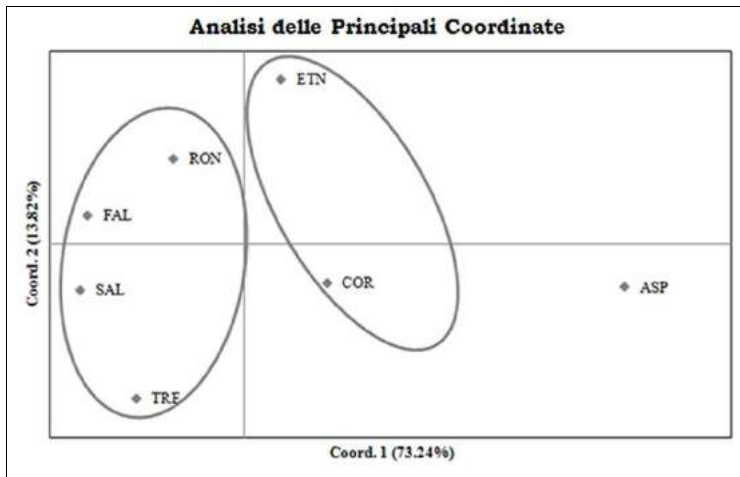


Figura 1. Analisi delle Principali Coordinate (PCoA) delle 7 popolazioni di *Pinus laricio* campionate (Tab. 1), ordinate sulla base dei valori delle distanze genetiche calcolate secondo Nei (1978).

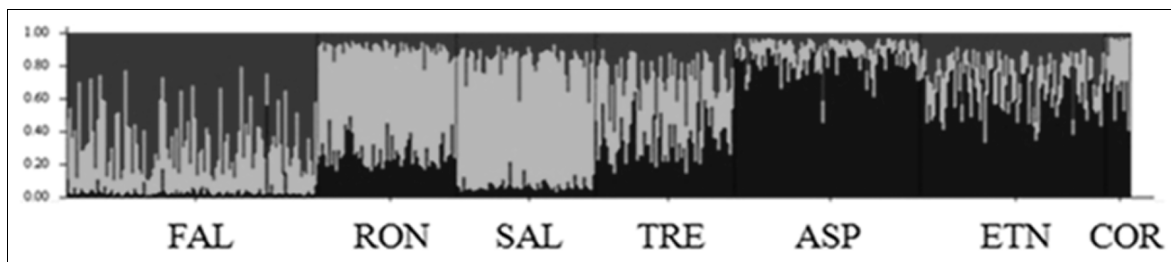


Figura 2. Struttura genetica delle popolazioni naturali di *Pinus laricio* dedotta mediante il programma STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Nel grafico, ciascuna barra verticale rappresenta un individuo con un distinto genotipo.

## SUMMARY

### The first SSR-based assessment of genetic variation among *Pinus laricio* Poiret populations within their native area

The genetic difference among Calabrian pine (*Pinus laricio* Poiret) populations within their Italian native range (Calabria and Sicily), for the first time, has been characterized through the use of chloroplast and nuclear SSR molecular markers. Both the microsatellites are a useful tool for estimating genetic diversity, structure and genetic relationships within and among populations. Results issued from this study provide a basis for *laricio* pine conservation, exploitation of genetic resources and forest management.

## BIBLIOGRAFIA

- Avolio S., 2003 – *Schede monografiche delle specie forestali calabresi peculiari: Pino laricio*. In: *Foreste di Calabria*, Grafiche Ghiani (Cagliari). Pp. 252-254.
- Auckland L.D., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C.G., 2002 – *Conifer microsatellite handbook*. Corporate Press, Raleigh, N.C.
- González-Martínez S.C., Robledo-Arnuncio J.J., Collada C., Díaz A., Williams C.G., Alía R., Cervera M.T., 2004 – *Cross-amplification and sequence variation of*

*microsatellite loci in Eurasian hard pines*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (1): 103-111.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-004-1596-x>

- Naydenov K.D., Tremblay F.M., Fenton N.J., Alexandrov A., 2006 – *Structure of Pinus nigra Arn. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34 (7): 562-574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.011>

Nei M., 1978 – *Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals*. *Genetics*, 89 (3): 583-590.

Peakall R., Smouse P.E., 2006 – *GenALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1): 288-295.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000 – *Inference of population structure using multilocus genotype data*. *Genetics*, 155 (2): 945-959.

Soranzo N., Provan J., Powell W., 1999 – *An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers*. *Genome*, 42 (1): 158-161. <http://dx.doi.org/10.1139/g98-111>

Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P., Morgante R., 1996 – *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellite in Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5 (4): 595-598.

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00111>