

Le indagini genetiche svolte sui popolamenti di abete delle aree di intervento

Anna De Rogatis, Fulvio Ducci, Silvia Carnevale (CRA SEL – Arezzo)

Piero Belletti, Diana Ferrazini (DIVAPRA – Grugliasco)



CONSIGLIO PER LA RICERCA
E LA SPERIMENTAZIONE
IN AGRICOLTURA

CRA-SEL

CENTRO DI RICERCA
PER LA SELVICOLTURA



Gli studi della **variabilità genetica** e della **struttura genetica** delle popolazioni di una specie consente di conoscere la **ricchezza** e la **distribuzione della diversità genetica** sul territorio e di comprenderne la **capacità adattativa**.

Grazie a queste informazioni è possibile adottare **strategie dinamiche di gestione, di conservazione e di valorizzazione** delle risorse genetiche

- Sono stati utilizzati 2 microsatelliti cloroplastici(Vendramin&Ziegenhagen,1996), 7 microsatelliti nucleari (Cremer et al. 2006), amplificati con profili PCR degli stessi autori, modificati, poi analizzati con sequenziatori ABI Prisma 310 e ABI Prisma 3730xl ed i dati poi letti con software GeneMapper 4.1

Per ogni parcella sono stati calcolati differenti parametri genetici:

- grado di variabilità allelica (N_a , N_e),
- diversità genetica (H_o , H_e),
- coefficiente di inbreeding F_{is} , F_{st} e F_{it} , secondo la statistica di Wright
- AMOVA
- distanze genetiche
- dendrogramma UPGMA
- analisi delle Coordinate Principali
- dendrogramma classi di età per valutare il livello di parentela tra le classi

Verrà poi valutata la presenza dell'allele nullo e ricalcolati gli indici F e il confronto dei risultati con quelli che saranno ottenuti i microsatelliti plastidiali.

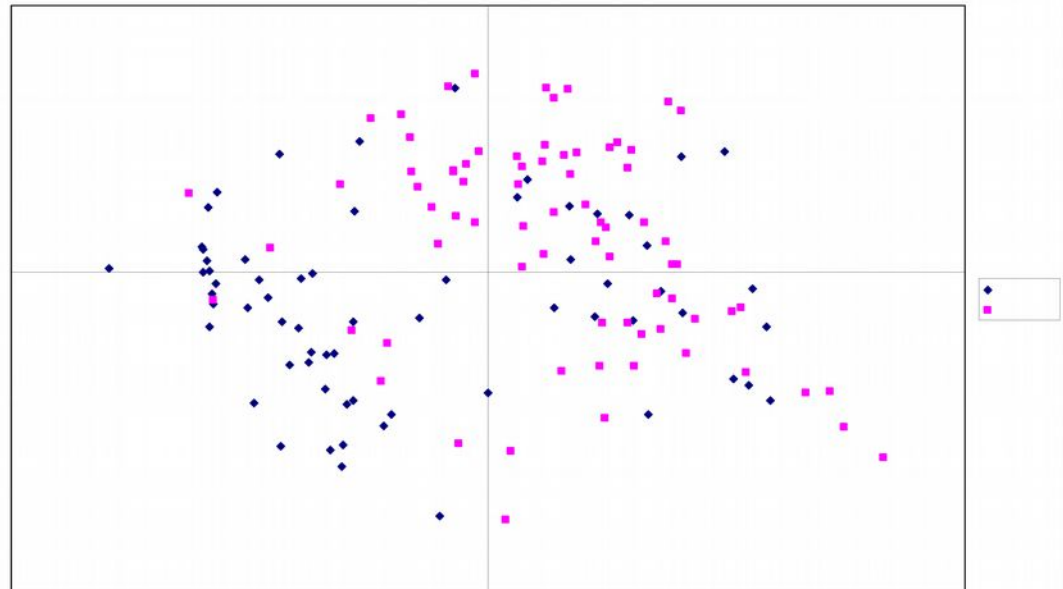
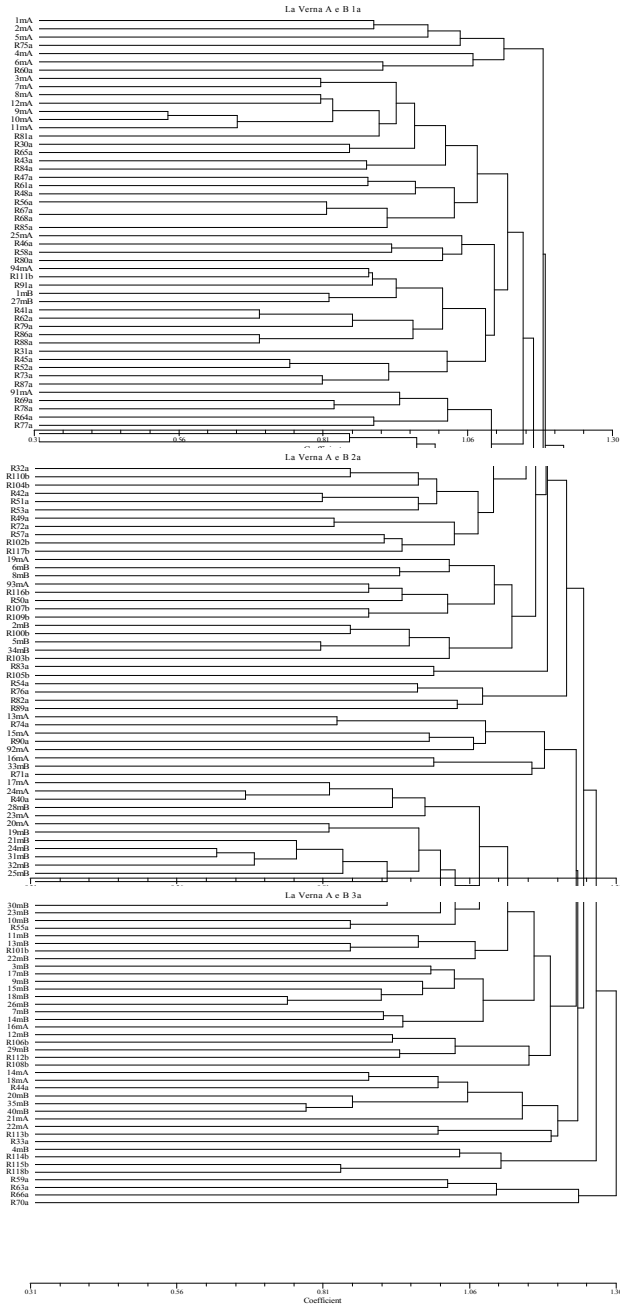
LA VERNA – Confronto tra Adulte (in alto) e Rinnovazione (in basso)

SSR locus	N	Na	Ne	Ho	He	χ^2	P	F
SF1	65	6	4,23	0,60	0,76	71,76	***	0,21
	75	5	2,62	0,57	0,62	74,92		0,07
SF b4	65	10	5,83	0,75	0,83	54,29	NS	0,09
	75	11	7,80	0,64	0,87	123,69	***	0,27
SF g6	65	5	3,00	0,71	0,67	102,42	***	-0,06
	75	6	3,09	0,63	0,68	65,66		0,07
SF 78	65	22	6,89	0,78	0,85	418,39	***	0,08
	75	22	12,92	0,76	0,92	294,26	**	0,18
SF 333	65	8	5,60	0,58	0,82	110,36	***	0,29
	75	9	5,30	0,32	0,81	258,71		0,61
SF b5	65	10	5,14	0,74	0,80	186,23	***	0,08
	75	13	5,34	0,61	0,81	187,56		0,24
SF 324	65	5	2,68	0,78	0,63	92,40	***	-0,25
	75	5	2,20	0,72	0,54	100,97		-0,32
Adulte	65	9	4,767	0,708	0,767	147,979	***	0,064
Rinnov	75	10	5,610	0,608	0,751	157,967	***	0,160
MEAN	140	10	5,188	0,658	0,759	159,973	***	0,112

Numero piante (N), Numero totale di alleli per locus (na), . numero effettivo di alleli per locus (ne eterozigosi osservata (Ho), eterozigosi aspettata (He) , Hardy-Weinberg test (χ^2 Chi quadro), P significatività *** P-value: <0.001, ** P-value: <0.01, * P-value: <0.05, ND= no deviazione, NS= non signific. Indice di Fissazione (F) (GenAlEx).

LA VERNA – Dendrogramma UPGMA e Analisi delle Coordinate principali dell'intera popolazione

- notevole variabilità intra-popolazione
- 6 grandi cluster, non ben definiti
- differenziazione genetica tra delle due differenti esposizioni A e B (adulte e rinnovazione)
vicinanza genetica tra adulte e rinnovazione ma non corrispondente a disposizione spaziale tra madri e rinnovazione sottostante.



LA VERNA - Confronto tra Piante adulte e Piante rinnovazione.

SSR locus	F _{is}	F _{it}	F _{st}
SF1	0,151	0,212	0,071
SF b4	0,180	0,185	0,006
SF g6	0,007	0,014	0,007
SF 78	0,131	0,148	0,019
SF 333	0,446	0,447	0,002
SF b5	0,165	0,167	0,003
SF 324	-0,283	-0,273	0,009
MEAN	0,114	0,129	0,017

Statistica di Wright sulle componenti di variabilità genetica.

Coefficienti di *inbreeding* Fis, Fst e Fit, che misurano l'*inbreeding* (livello di parentela) degli individui rispetto alla subpopolazione cui appartengono, alle diverse popolazioni e al totale delle popolazioni

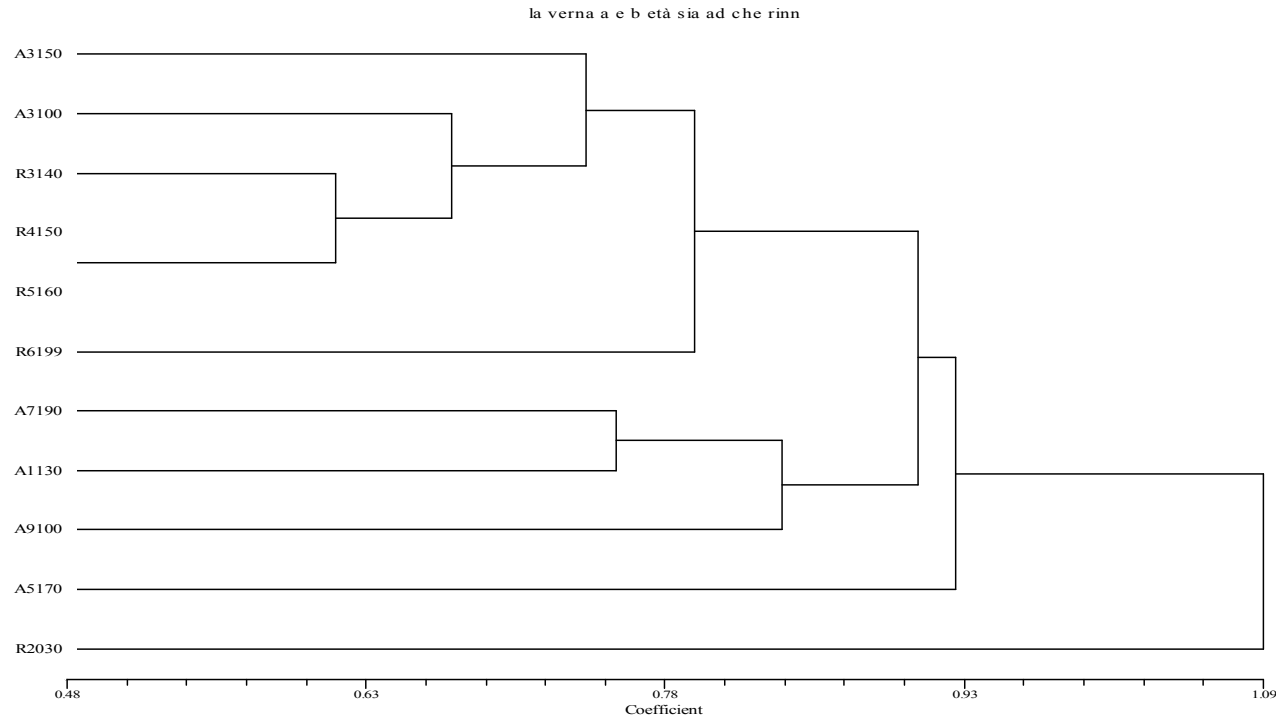
Fis = componente di variabilità tra individui relativa alle sub-pop,
Fit= componente della variabilità tra individui relativa al totale
pop, Fst= componente di variabilità tra sub-pop relativa al tot.

AMOVA. GL= (gradi di libertà. SS= somma degli scarti al quadrato – devianza, MS = media degli scarti al quadrato – varianza , Est. Var

Fonti di variazione	GL	SS	MS	Est. Var	%
Tra popolazioni	1	24,954	24,954	0,270	4%
Entro popolazione	138	845,617	6,128	6,128	96%
Totale	139	870,571		6,398	100%

Dendrogramma - La Verna – Relazione tra classi di età della rinnovazione e classi di età delle adulte.

A = adulte, classi = **31-50 (A3150)**; 51-70 (A5170); 71-90 (A7190); 91-100 (A9100); 110-130 (A1130); > 131 (**A3100**) - R = rinnov, classi = 20-30 (R2030); **31-40 (R3140)**; **41-50 (R4150)**; 51-60 (R5160); >61 (R6199).



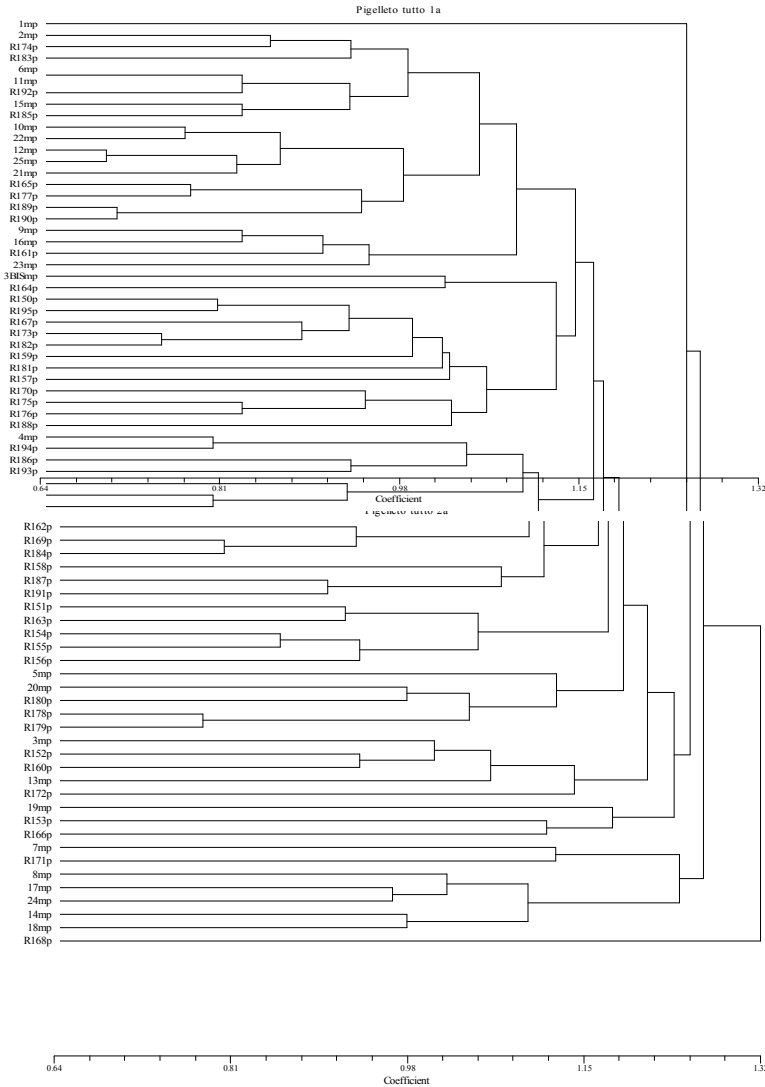
- Maggiore vicinanza genetica delle piante adulte comprese tra i 30 e i 50 anni e quelle al di sopra dei 130 anni con la rinnovazione compresa tra i 30 e i 60 anni o anche di età comprese 61 e 99 anni
- Le adulte delle classi di età 30-50 anni si ipotizza che possano essere le coetanee che hanno avuto modo di svilupparsi ed entrare nel piano dominante
- Quelle al di sopra di 130 anni potrebbero rappresentare i genitori
- Le altre classi di età del piano dominante sono geneticamente più vicine tra loro ed eventualmente con la rinnovazione tra 20 e 30 anni
- Questo era evidente anche nella PCoA.

PIGELLETO - Confronto tra Piante Adulte e Rinnovazione

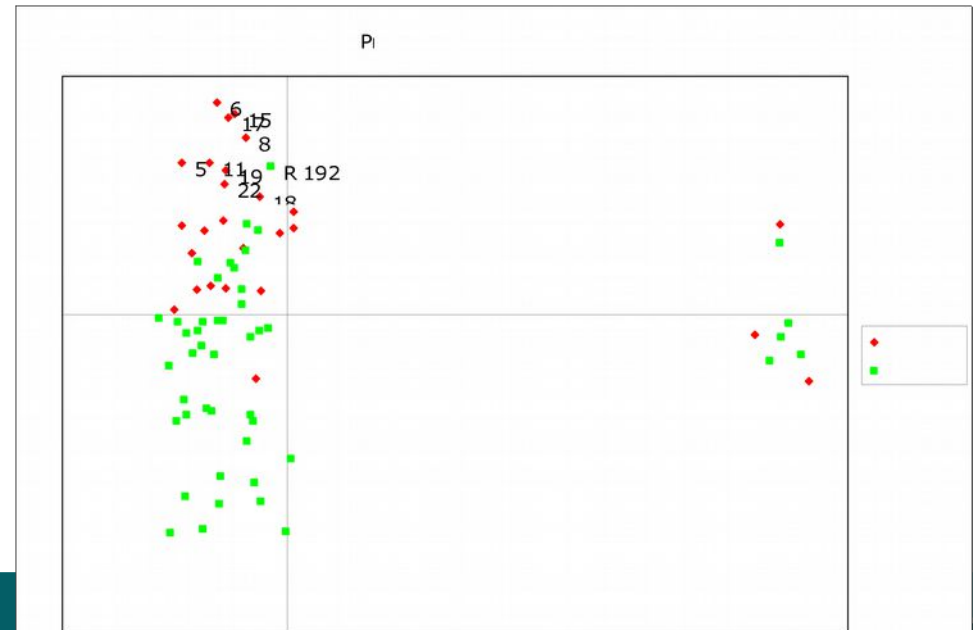
SSR locus	N	Na	Ne	Ho	He	χ^2	P	F
SF1	26	5	3,77	0,69	0,73	38,66	***	0,06
	46	4	1,75	0,50	0,43	51,42		-0,17
SF b4	26	9	3,09	0,65	0,68	67,73	**	0,03
	46	11	6,56	0,85	0,85	79,46	*	0,00
SF g6	26	4	2,40	0,81	0,58	21,55	**	-0,38
	46	4	2,75	0,80	0,64	23,17	***	-0,26
SF 78	26	18	10,99	0,88	0,91	162,06	NS	0,03
	46	15	10,45	0,83	0,90	99,40		0,09
SF 333	26	6	3,93	0,35	0,75	48,33	***	0,54
	46	6	4,75	0,41	0,79	107,65		0,48
SF b5	26	9	4,73	0,61	0,79	107,75	***	0,22
	46	10	4,48	0,56	0,78	77,15	*	0,27
SF 324	26	5	2,69	0,69	0,63	36,74	***	-0,10
	46	5	2,28	0,52	0,56	53,88		0,07
Adulte	26	8	4,81	0,670	0,724	68,974	***	0,055
	46							
Rinnov	26	8	4,72	0,640	0,715	70,304	**	0,068
	46							
MEAN	36	8	4,616	0,655	0,715	69,639	**	0,061

Numero delle piante analizzate (N), Numero totale di alleli per locus (na), . numero effettivo di alleli per locus (ne), eterozigosi osservata (Ho), eterozigosi aspettata (He) , Hardy-Weinberg test (χ^2 Chi quadro), P significatività *** P-value: <0.001, ** P-value: <0.01, * P-value: <0.05, ND= no deviazione, NS= non signific.Indice di Fissazione (F) (GenAlEx).I primi valori sono gli adulti, i secondi la rinnovazione (GenAlEx).

PIGELLETO – Dendrogramma intera popolazione e Analisi delle Coordinate Principali



- notevole variabilità intra-popolazione
- 6 grandi cluster, non ben definiti
- vicinanza genetica tra adulte e rinnovazione ma non corrispondente a disposizione spaziale tra madri e rinnovazione sottostante



PIGELLETO - Confronto tra Piante Adulte e Rinnovazione

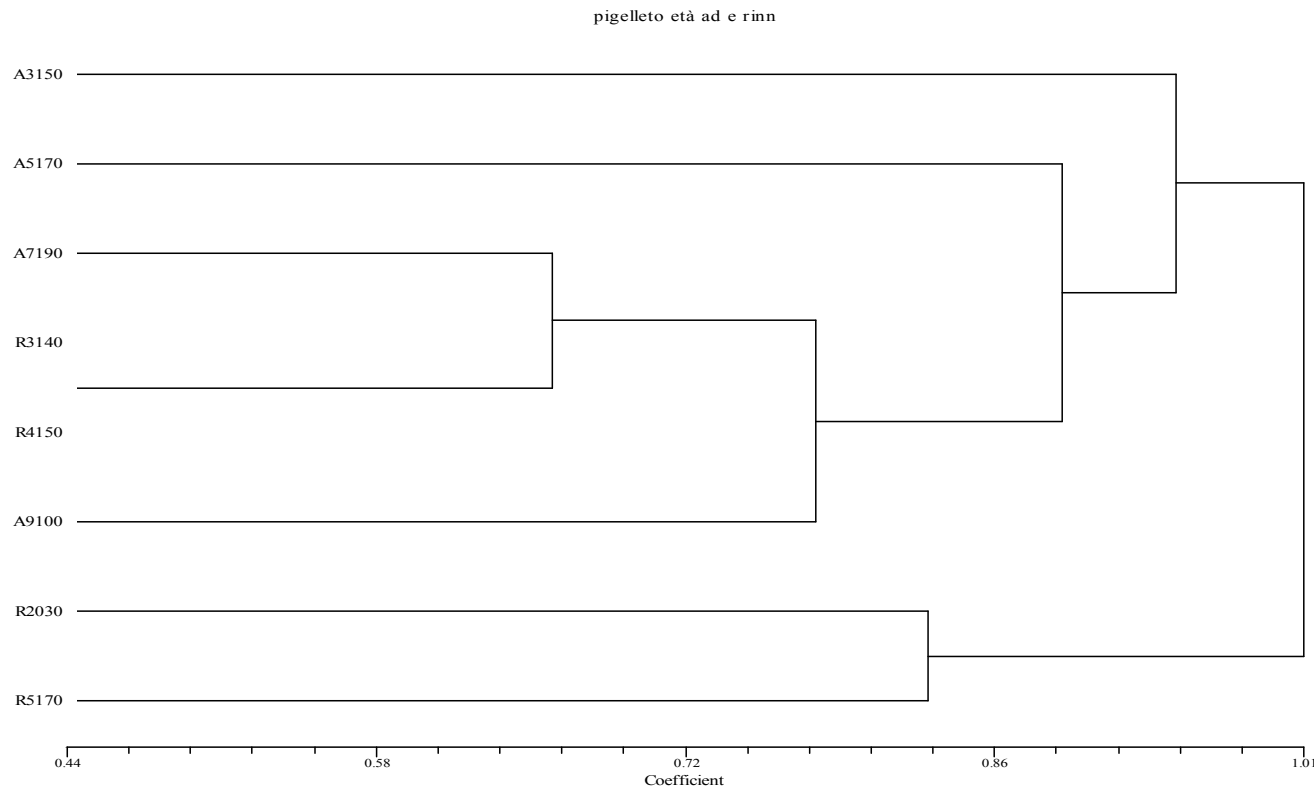
locus	F _{is}	F _{it}	F _{st}
SF1	-0,026	0,061	0,084
SF b4	0,014	0,057	0,043
SF g6	-0,321	-0,266	0,042
SF 78	0,057	0,065	0,009
SF 333	0,505	0,511	0,011
SF b5	0,246	0,252	0,009
SF 324	-0,020	-0,011	0,009
MEAN	0,065	0,095	0,029

Statistica di Wright sulle componenti di variabilità genetica. Coefficienti di *inbreeding* F_{is} , F_{st} e F_{it} , che misurano l'*inbreeding* (livello di parentela) degli individui rispetto alla subpopolazione cui appartengono, alle diverse popolazioni e al totale delle popolazioni F_{is} = componente di variabilità tra individui relativa alle sub-pop, F_{it} = componente della variabilità tra individui relativa al totale pop, F_{st} = componente di variabilità tra sub-pop relativa al tot

AMOVA. GL= (gradi di libertà. SS= somma degli scarti al quadrato – devianza, MS = media degli scarti al quadrato – varianza

Fonti di variazione	GL	SS	MS	Est. Var.	%
Tra popolazioni	1	19,036	19,036	0,405	7%
Entro popolazione	70	390,298	5,576	5,576	93%
Totale	71	409,333		5,981	100%

Dendrogramma di Pigelleto – Relazione tra classi di età della rinnovazione e classi di età delle adulte. Legenda: A = adulte, classi = 31-50 (A3150); 51-70 (A5170); **71-90 (A7190)**; >91 (A9100) - R = rinnov, classi = 20-30 (R2030); **31-40 (R3140)**; **41-50 (R4150)**; 51-70 (R5170).

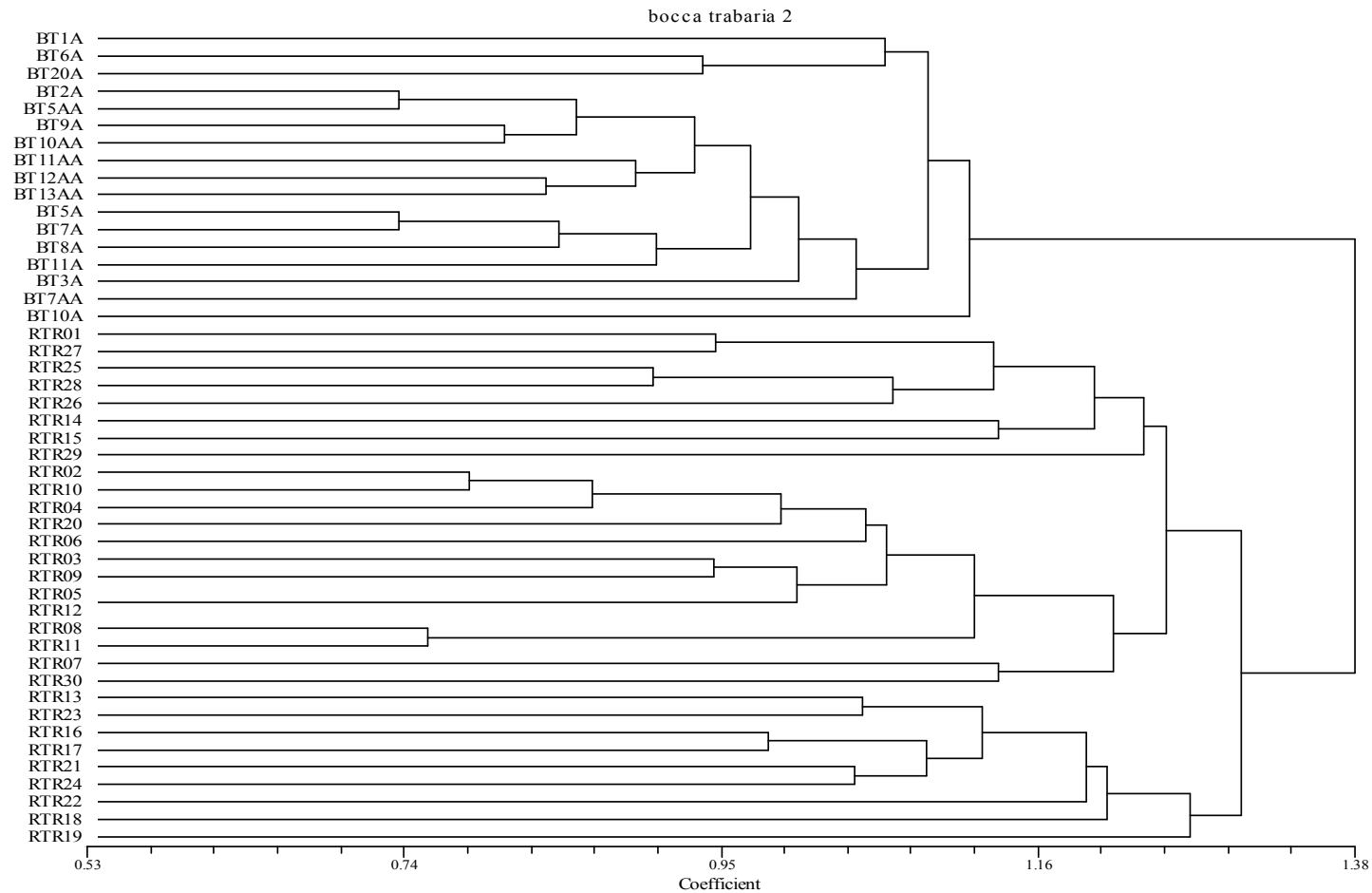


- Maggiore vicinanza genetica delle piante adulte comprese tra i 70 e i 90 anni e quelle al di sopra dei 90 anni, con la rinnovazione compresa tra i 30 e i 50 anni
- vicinanza tra la rinnovazione di 20-30 anni e la rinnovazione di tra i 51 e i 70 anni
- Si può quindi supporre che le più giovani potrebbero essere state prodotte proprio da quel gruppo di piante della rinnovazione, che si trovano in un piano dominato ma che hanno in realtà la medesima età delle adulte del piano dominante.
- Questo era evidente anche nella PCoA.

SSR locus	N	Na	Ne	Ho	He	χ^2	P	F
SF1	47	5	3,79	0,74	0,74	56,58	***	-0,01
SF b4	47	15	8,11	0,83	0,88	128,35	NS	0,05
SF g6	47	6	4,06	0,50	0,75	91,57	***	0,34
SF 78	47	22	14,25	0,74	0,93	358,95	***	0,20
SF 333	47	10	6,54	0,57	0,85	79,09	**	0,32
SF b5	47	11	8,24	0,74	0,88	137,13	***	0,15
SF 324	47	4	3,24	0,55	0,69	44,85	***	0,20
MEAN	47	10	6,889	0,670	0,816	128,074	***	0,179

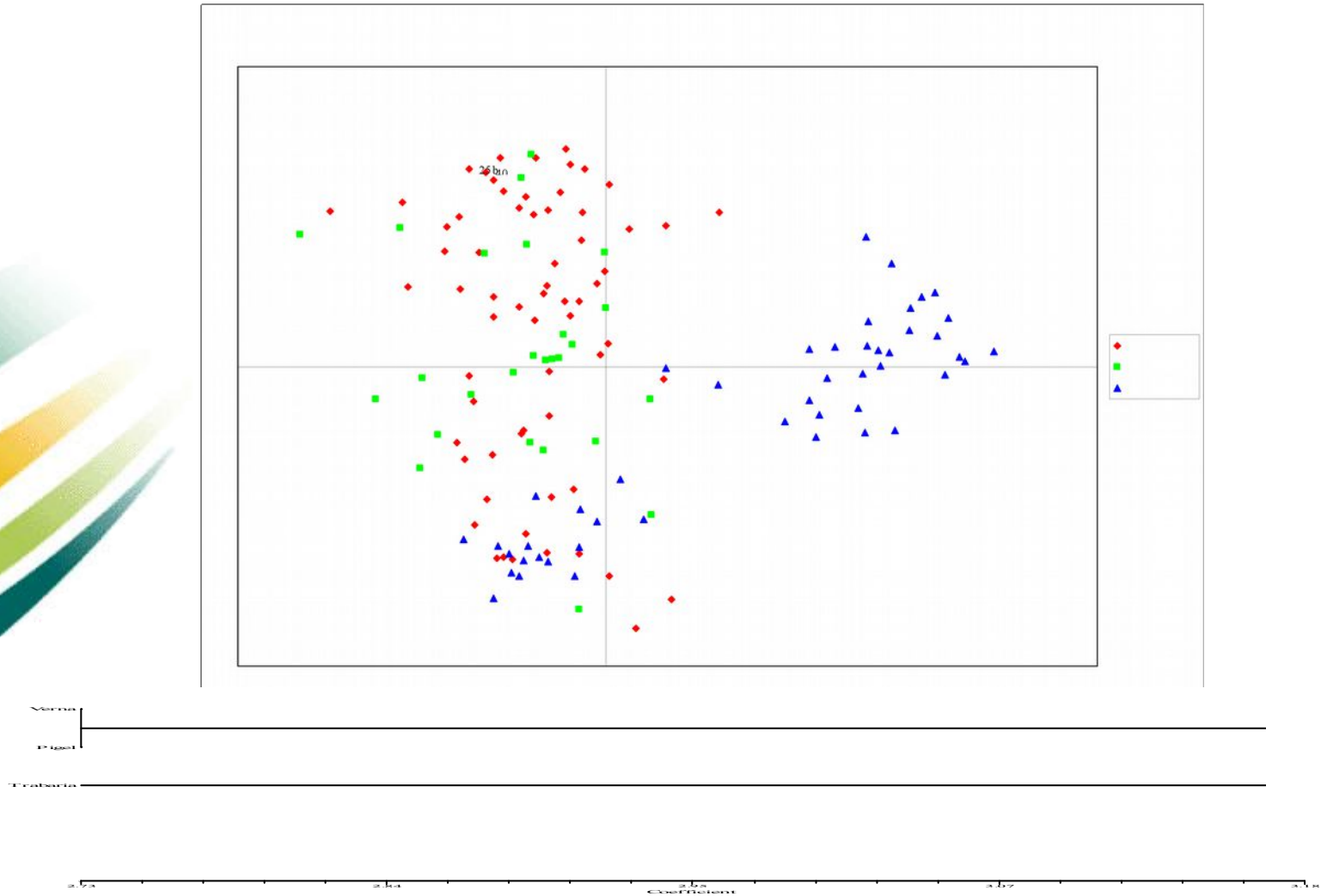
Numero totale di alleli per locus (na), . numero effettivo di alleli per locus (ne), eterozigosi osservata (Ho), eterozigosi aspettata (He) , Hardy-Weinberg test (χ^2 Chi quadro), P significatività *** P-value: <0.001, ** P-value: <0.01, * P-value: <0.05, ND= no deviazione, NS= non signific. Indice di Fissazione (F)

BOCCA TRABARIA -



- notevole variabilità intra-popolazione, eccetto tra RTR05 e RTR12 che appaiono geneticamente vicine
- quattro grandi cluster, definiti
- differenziate tra le piante delle due zone, zona alta siglata con BT e zona bassa siglata con RTR

Confronto dei 3 siti tra di loro. Analisi delle Coordinate Principali e dendrogramma: Bocca Trabaria si discosta notevolmente dalle altre due popolazioni



- Nei tre siti studiati, valori di variabilità genetica discreti, sia nei valori di variabilità allelica che diversità genica (H_e)
- Le popolazioni di La Verna e Pigelleto sono geneticamente più vicine tra loro mentre Bocca Trabaria si discosta, presentando alleli caratterizzanti (private alleles)
- In queste popolazioni di *Abies alba* risulta più significativa la variabilità individuale delle piante che quella tra popolazioni
- L'eterozigosità osservata risulta inferiore a quella attesa, facendo supporre che c'è inbreeding
- Dai valori dell'indice di fissazione F , positivi nella media, è confermata una deficienza di eterozigosità
- I valori di χ^2 indicano che le popolazione si discosta dall'equilibrio di Hardy Weinberg infatti il P value è altamente significativo
- In La Verna e Pigelleto, scarsa differenziazione tra adulte e rinnovazione (rinnovazione naturale).
- La popolazione di Pigelleto presenta una distribuzione spaziale della rinnovazione più uniforme nell'area studiata, un indice di fissazione più basso, forse una maggiore capacità di conservazione della diversità genetica
- Mentre in La Verna la rinnovazione è a gruppi, nelle zone con microclima più idoneo ed essenzialmente nel versante A, più favorevole
- La specie in queste popolazioni mostra una capacità di diffusione abbastanza elevato, infatti le piante della rinnovazione non sono risultate geneticamente vicine alle ipotetiche piante madri sovrastanti

- Nelle due popolazioni in cui sono state confrontate anche le età delle piante appartenenti al piano dominante (adulte) e al piano dominato (rinnovazione) è risultato che una parte delle rinnovazioni sono piante in realtà adulte, con età corrispondente a quelle del piano dominante, che evidentemente non hanno avuto modo di svilupparsi, non trovando spazio e luce sufficiente o per fattori competitivi con le piante circostanti
- Dai risultati preliminari si può supporre che le popolazioni studiate sono caratterizzate da un discreto gene flow e una notevole capacità adattativi e di plasticità
- Da questo lavoro si evidenzia l'importanza di propagare un elevato numero di piante per la produzione del materiale di propagazione da utilizzare nelle filiere vivaistiche per mantenere elevata la variabilità genetica della specie
- Dal confronto dei risultati genetici e di quelli dei caratteri adattativi oggetto di studio in questo progetto si potranno individuare le piante più plastiche
- Per quanto occorre ricordare che le parti del genoma individuate con i marcatori SSR non sono normalmente codificanti e quindi associabili a espressione genica



Grazie per l'attenzione