

Aspetti biologici, ecologici e genetici di popolamenti di frassino ossifillo (*Fraxinus angustifolia* Vahl) dell'Italia nord-orientale

Piero Belletti* ⁽¹⁾, Paolo Camerano ⁽²⁾, Diana Ferrazzini ⁽¹⁾, Roberto Fiorentin ⁽³⁾, Francesco Pernigotto Cego ⁽³⁾

(1) Università di Torino, DISAFA Genetica Agraria, l.go P. Braccini 2, I-10095 Grugliasco, TO (Italy); (2) IPLA SpA, Unità Operativa Biodiversità, Foreste e Paesaggio, c.so Casale 476, I-10132 Torino (Italy); (3) Veneto Agricoltura, Centro Biodiversità Vegetale e Fuori Foresta, v. Bonin Longare 4, I-36030 Montebelluna, VI (Italy) - *Corresponding Author: Piero Belletti (piero.belletti@unito.it).

Abstract: Biological, ecological and genetic characteristics of Narrow leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) populations in northeastern Italy. Narrow leaved ash (*Fraxinus angustifolia* Vahl) is an important forest tree belonging to peculiar and threatened ecosystems, where it forms mixed populations with other deciduous trees. Its range partly overlaps with that of European ash (*Fraxinus excelsior*) and interspecific cross is possible. These habitats are of the utmost importance due to their high level of biodiversity, but highly threatened by human activities. Since climate change is expected to favor the diffusion of narrow leaved ash, a study was carried out with the aim of enhancing our knowledge of the biological, ecological and genetic aspects of this species. Twelve populations of narrow leaved ash from north-eastern Italy were sampled and their genetic variability was analyzed by means of six molecular markers (nuclear microsatellites), of which 4 gave consistent and repeatable results. Overall, 113 alleles were observed, of which 38 were present in only one population (private alleles). Consistent levels of genetic variability was found (mean number of alleles per locus = 7.08, effective number of alleles per locus = 4.37, expected heterozygosity = 0.613), though lower than those reported in the literature. Fixation index was very close to zero, indicating a good agreement with Hardy-Weinberg's expectations. The genetic differentiation among populations was significant (both G_{ST} e F_{ST} as high as 0.102), although it was not possible to correlate the distribution of genetic variability with ecological or geographical factors. Genetic pools of *F. excelsior* and *F. angustifolia* were distinct, though several individuals showed intermediate genetic characteristics, especially in the population from Grotta di Farra where both species are present and many individuals showed intermediate morphological features. The presence of individuals possibly originated by interspecific cross should be taken into account in the case of seed collection. Our results may contribute to a rationale management of genetic resources of narrow leaved ash, also considering the current legislation on forest reproductive material.

Keywords: Narrow Leaved Ash, nSSR Markers, Genetic Variability, Genetic Differentiation, Interspecific Hybridization, Regions Of Provenance, Seed Stands

Received: Mar 02, 2015; Accepted: Jun 29, 2015; Published online: Aug 08, 2015

Citation: Belletti P, Camerano P, Ferrazzini D, Fiorentin R, Pernigotto Cego F, 2015. Aspetti biologici, ecologici e genetici di popolamenti di frassino ossifillo (*Fraxinus angustifolia* Vahl) dell'Italia nord-orientale. Forest@ (early view): e1-e16 [online 2015-08-08] URL: <http://www.sisef.it/forest@/show.php?id=1628>

Introduzione

Le foreste sono soggette a numerosi fattori di stress, per la maggior parte dovuti all'azione antropica: deforestazione o gestione irrazionale, frammenta-

zione degli habitat, introduzione di specie alloctone, ampliamento di superfici urbanizzate o destinate ad attività agricole, ecc. La situazione è resa più problematica dai cambiamenti climatici in atto, i quali pos-

sono accentuare le difficoltà di crescita e sopravvivenza degli alberi, nonché alterare i livelli di biodiversità e la struttura genetica propri dei popolamenti forestali. Tale aspetto riveste particolare importanza nelle aree periferiche e/o marginali di diffusione delle varie specie, quali in particolare l'area mediterranea (Jump & Peñuelas 2006, Reich & Oleksyn 2008, Leonardi et al. 2012). La più importante strategia per la salvaguardia delle foreste risiede nella conservazione del loro potenziale adattativo, il quale è strettamente legato ai livelli di variabilità genetica presenti nell'ecosistema e tra individui appartenenti alla stessa specie (Tessier du Cros et al. 1999, Kramer & Havens 2009). La differenziazione genetica tra popolamenti deriva a sua volta dall'azione di numerose forze evolutive, tra cui la pressione selettiva a differenti condizioni ecologiche e la deriva genetica sono le più importanti. Il flusso genico tende a contrastare tale processo, riducendo l'eterogeneità delle frequenze alleliche tra le varie popolazioni.

La caratterizzazione della variabilità genetica all'interno e tra popolazioni di specie forestali rappresenta quindi un presupposto fondamentale per la definizione di strategie volte a salvaguardare la loro biodiversità. I marcatori genetici rappresentano uno strumento di grande importanza per ricavare dati e informazioni sui livelli di variabilità e sulla struttura genetica delle popolazioni (Pautasso 2009), nonché per fornire indicazioni relative alla gestione dei materiali forestali di propagazione, soprattutto nel caso in cui l'obiettivo principale degli interventi sia quello della ricostituzione di ecosistemi naturaliformi (Escudero et al. 2003, Väli et al. 2008).

Il frassino ossifillo (*Fraxinus angustifolia* Vahl) è un costituente importante delle foreste ripariali delle pianure alluvionali, ove forma popolamenti misti con altre latifoglie. Si tratti di ambienti preziosi dal punto di vista della biodiversità in essi presente, ma ormai rari a seguito dell'impatto negativo delle azioni antropiche. Poiché le modificazioni climatiche in atto potrebbero favorire la diffusione delle specie a carattere maggiormente termofilo, appare importante approfondire le conoscenze sulle risorse genetiche del frassino ossifillo.

La specie oggetto di analisi

Il genere *Fraxinus* appartiene alla famiglia delle *Oleaceae* e comprende 43 specie distribuite nelle aree temperate e subtropicali dell'emisfero settentrionale, di cui 24 in ambito europeo (Wallander & Albert 2000). Si tratta quasi esclusivamente di alberi decidui, sebbene siano presenti anche alcuni esempi di

cespugli sempreverdi, diffusi soprattutto in zone semiaride. La maggior parte delle specie (circa i due terzi) è caratterizzata da impollinazione anemofila: le rimanenti (entomofile) sono diffuse prevalentemente in Asia.

In Italia crescono tre specie di frassini: il frassino maggiore o comune (*Fraxinus excelsior* L.), il frassino ossifillo o meridionale (*F. angustifolia* Vahl) e l'orniello (*F. ornus* L.). Mentre le prime due appartengono alla sezione *Fraxinaster* e presentano una impollinazione anemofila, l'orniello (sezione *Ornus*) presenta fiori molto attrattivi per gli insetti. Frassino maggiore ed ossifillo sono strettamente correlati e non sempre la loro distinzione è facile, soprattutto nell'ambito di boschi in cui si trovano entrambe le specie. La situazione è complicata dal fatto che le due specie possono dare origine ad individui ibridi (Rameau et al. 1989, Jeandroz et al. 1996, Fernandez-Manjarres et al. 2006). Benché si tratti di una specie naturalmente molto variabile, nell'ambito del frassino ossifillo sono state individuate alcune sottospecie, le cui differenziazioni si basano soprattutto sulla forma dei frutti e delle foglie e che presentano anche una distribuzione geografica differenziata: *angustifolia* (bacino mediterraneo occidentale), *oxycarpa* (Europa centrale e meridionale) e *syriaca* (dalla Turchia fino al limite orientale di diffusione della specie). La classificazione intraspecifica è tuttavia resa difficoltosa dalla presenza di numerose forme intermedie.

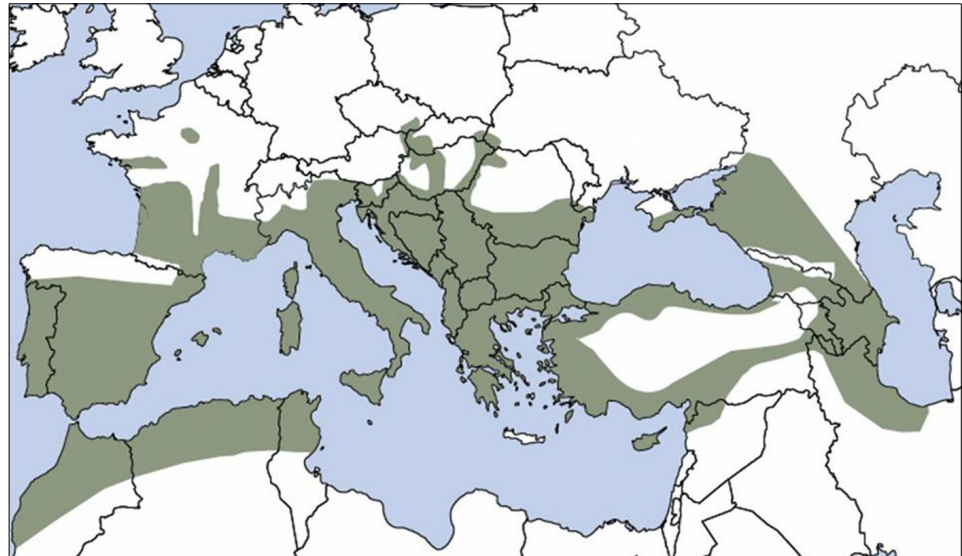
Il frassino ossifillo è comune nella penisola Iberica e lungo tutte le aree costiere del Mediterraneo. È diffuso anche in Marocco, Algeria e Tunisia, mentre ad est si spinge fino al mar Caspio (Fig. 1).

Nell'Italia settentrionale il frassino ossifillo è componente dei boschi planiziali relitti, frequente solo nella parte orientale e meridionale della Pianura Padana (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Emilia Romagna); diviene più sporadico a partire dall'Emilia Romagna e dalla Lombardia occidentali verso nord-ovest, mentre ad ovest del Ticino è da considerare non autoctono. Importante componente delle selve umide dei litorali tirrenici, questa specie può risalire fino a quote submontane nell'Italia centro-meridionale, soprattutto lungo impluvi con condizioni pedoclimatiche favorevoli (Bernetti 1998).

Criteri di distinzione tra frassino maggiore e ossifillo

Sebbene le due specie siano strettamente correlate, esistono alcuni caratteri che consentono la loro distinzione (FRAXIGEN 2005). Il più efficace riguarda il tipo di infiorescenza, che è composta (panicolo) nel

Fig. 1 - Distribuzione naturale del frassino ossifillo (*F. angustifolia*) in Europa (da FRAXIGEN 2005).



frassino maggiore, mentre è semplice e priva di diramazioni laterali (racemo) nell'ossifillo. Ne consegue che le infiorescenze della prima specie contengono un numero di fiori molto maggiore rispetto a quelle della seconda. Questa caratteristica può essere facilmente osservata anche quando i semi sono maturi o addirittura già parzialmente staccati. Come detto, si tratta del carattere distintivo più affidabile, con l'eccezione di alcuni individui subandroici di frassino maggiore, nelle cui infiorescenze si trovano fiori ermafroditi lungo l'asse principale e fiori maschili sulle ramificazioni laterali. Dopo l'impollinazione questi ultimi cadono, per cui l'infruttescenza assume la forma di un racemo, facilmente confondibile con quella del frassino ossifillo.

Il colore delle gemme è normalmente nero nel frassino maggiore e bruno nell'ossifillo: tuttavia è presente (soprattutto nella seconda specie) una certa variabilità, che non sempre consente diagnosi precise. Nonostante l'elevato livello di variabilità ostacoli la distinzione delle due specie sulla base delle sole caratteristiche fogliari, si riportano di seguito le differenze più costanti nell'aspetto delle foglie (Pignatti 1982, Tasinazzo & Dal Lago 1999, Aeschmann et al. 2004):

- Frassino maggiore: foglioline di norma in numero di 7-15, con nervature secondarie irregolarmente ramificate, non sempre raggiungenti il margine fogliare. Dentelli del margine fogliare regolari, in numero maggiore rispetto alle nervature secondarie, con apice solitamente rivolto verso l'interno della foglia.
- Frassino ossifillo: foglioline di norma in numero di 3-11, con nervature secondarie perlopiù non o poco ramificate, raggiungenti il margine fogliare, il qua-

le in corrispondenza delle nervature è dentellato, con dentelli irregolari, in numero pari al numero di nervature secondarie ed apice frequentemente rivolto verso l'esterno della foglia.

Risorse genetiche

Attualmente nel Registro Europeo dei Materiali di Base, previsto dalla Direttiva CEE n. 105 del 1999 sui materiali forestali di riproduzione, recepita nel nostro Paese con il Decreto Legislativo 386 del 2003 (http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/eu_marketing_requirements/forest_material_en.htm), sono registrate 561 provenienze di frassino ossifillo, di cui 491 nella categoria "Identificati alla Fonte" (430 Fonti di Seme e 61 Soprassuoli), 37 in quella "Selezionati" (tutti Soprassuoli) e 33 in quella "Qualificati" (4 Arboreti da Seme e 29 Genitori); la maggior parte di tali provenienze (370) è localizzata in Spagna, cui segue come importanza la Croazia.

In Italia sono stati catalogati complessivamente 32 popolamenti forestali idonei alla raccolta di seme di frassino ossifillo, di cui uno solo appartenente alla categoria "Selezionati" (Tab. 1).

All'interno del progetto europeo EUFGIS (<http://portal.eufgis.org>), inoltre, sono monitorate e oggetto di studio 18 provenienze europee, in parte coincidenti con i materiali di base iscritti nei Registri Nazionali ed Europeo, di cui due in Italia (San Rossore, in provincia di Pisa, e Grotticelle, in provincia di Potenza).

Aspetti biologici

Il frassino ossifillo è una specie anemofila. Le sue infiorescenze possono essere costituite da fiori solo maschili, solo ermafroditi oppure da un insieme dei

Tab. 1 - Elenco dei materiali forestali di base per il frassino ossifillo in Italia. Tutti i popolamenti appartengono alla categoria "Identificato alla fonte", eccetto l'ultimo che appartiene alla categoria "Selezionati". (MdB): Materiali di Base; (SO): soprassuolo; (FS): fonte di semi.

Regione	Popolamento	Codice Regionale	Tipo di MdB	Riferimento legislativo Regionale
Lombardia	Magenta/Robecco sul Naviglio (MI)	fan/B-BP/LOM-MI003	SO	DGR 8/6272 del 21/12/2007, DD 4380 del 21/5/2012
	Marmirolo (MN)	fan/B-BP/LOM-MN001	SO	
	Marcaria (MN)	fan/B-BP/LOM-MN006	SO	
Sicilia	B. Ficuzza	Sicilia 2	SO	Piano Forestale Regionale DP 158/S.6/SG del 10/04/2012
	V. Anapo	Sicilia 16	FS	
	B. Isnello	Sicilia 27	FS	
Friuli	San Vito al Tagliamento (PN)	B/FVG (125)	FS	LR 11/2002, DD
Venezia-Giulia	Bosco Baredi - Selva d'Arvonchi (Muzzana del Turgnano, UD)	B/FVG (123)	FS	1917/2010
	Buja, ponte sul Corno (UD)	B/FVG (001)	FS	
	Muzzana del Turgnano, Bonifica di Muzzana (UD)	B/FVG (015)	FS	
	Sesto al Reghena (PN)	B/FVG (126)	FS	
	Buja, Case Rafael (UD)	B/FVG (067)	FS	
	Palude di Sablici (Doberdò del Lago, GO)	A/FVG (124)	FS	
	Isola della Cona (R.N. Foce Isonzo) - Staranzano, GO	A/FVG (122)	FS	
	Bosco "Baredi" - Selva d'Arvonchi (Muzzana del Turgnano, UD)	B/FVG (121)	FS	
Veneto	Lison (Portogruaro, VE)	B/VEN (B/VE 013)	FS	DGR 3263 del 15/10/2004
	Lama Polesine (Ceregnano, RO)	B/VEN (B/VE 106)	FS	
	Torretta/Tartaro (Legnago, VR)	B/VEN (B/VE 131)	FS	
	S. Martino di Colle Umberto (Colle Umberto, TV)	B/VEN (B/VE 018)	FS	
	Isola d.Certosa/Laguna di Venezia (Venezia)	B/VEN (B/VE 105)	FS	
	Alvisopoli (Fossalta di Portogruaro, VE)	B/VEN (B/VE 148)	FS	
	Villa Furlanis/Portovecchio (Portogruaro, VE)	B/VEN (B/VE 149)	FS	
	Belfiore (Pramaggiore, VE)	B/VEN (B/VE 150)	FS	
Emilia-Romagna	Boschi di Carrega (PR)	330-fox-0023	SO	LR 10/2007 DD
	Bosco della Mesola (FE)	220-fox-0040	SO	5205/2008
	Santa Giustina (FE)	220-fox-0041	SO	
	Bosco Panfilia (FE)	120-fox-0042	SO	
	Pineta di Classe (RA)	220-fox-0045	SO	
	Carpi Nord (MO)	120-fox-0102	FS	
	Gorgo Antonelli (FE)	210-fox-0145	SO	
	Bolognina di Crevalcore (BO)	120-fox-0148	FS	
Toscana	San Rossore - San Giuliano Terme (PI)	Fan/C/TOS-0026	SO	-

due. Non sono mai state osservate infiorescenze costituite unicamente da fiori femminili, nemmeno con residui di stami. Poiché ciascun individuo porta sia

fiori maschili che bisessuati, si può affermare che le piante risultano essere ermafrodite. La fioritura del frassino ossifillo è più precoce rispetto a quella del

maggiore. Le infiorescenze fuoriescono da gemme laterali in tardo inverno (tra la fine di gennaio e l'inizio di marzo), da 2 a 11 settimane prima dell'espansione delle foglie: tale intervallo risulta più accentuato in ambito mediterraneo. Il frassino ossifillo è protogino, cioè la recettività degli stami dei fiori ermafroditi precede la maturazione del polline. Tuttavia, poiché vi è una considerevole sovrapposizione tra le due fioriture, l'autofecondazione è di fatto possibile. In presenza di stagioni autunnali ed invernali molto miti, la fioritura può essere anticipata al tardo novembre, subito dopo la caduta delle foglie. In tal caso, però, le infiorescenze possono essere danneggiate dai freddi invernali, per cui la produzione sementiera risulta spesso nulla. Le gelate sono infatti considerate il più importante fattore limitante la diffusione della specie: tuttavia, si ritiene che il frassino ossifillo trarrà vantaggio dai mutamenti climatici ampliando il suo areale nei prossimi anni (FRAXIGEN 2005).

Le infiorescenze presentano mediamente 15 fiori (leggermente di più nel caso di strutture miste, costituite cioè sia da fiori maschili che ermafroditi), quindi in numero nettamente inferiore rispetto al frassino maggiore. Lo sfasamento temporale di fioritura ostacola la formazione di ibridi tra frassino ossifillo e maggiore, anche laddove le due specie coesistono: tuttavia, soprattutto in determinate annate, la fine della fioritura della prima specie può sovrapporsi all'inizio di quella della seconda, per cui in realtà individui ibridi possono effettivamente originarsi, anche in numero consistente. È comunque più probabile trovare ibridi su portaseme appartenenti al frassino maggiore, in quanto il periodo di sovrapposizione tra la recettività dei fiori femminili del *F. excelsior* e il rilascio del polline di *F. angustifolia* è maggiore rispetto alla situazione inversa.

Aspetti ecologici

Il frassino ossifillo è una specie tendenzialmente eliofila, più termofila rispetto al frassino maggiore, come testimoniano il baricentro distributivo meridionale e la diffusione a quote minori, di temperamento mesoigrofilo. Predilige suoli alluvionali con reazione sub-neutra, fertili e profondi, con granulometria sottile, mostrando tolleranza per contenuti in argilla anche elevati. Il frassino ossifillo presenta una resistenza a situazioni di temporanea sommersione superiore rispetto a quella del frassino maggiore: rientra infatti nella composizione delle comunità forestali ripariali delle pianure e del tratto terminale dei corsi d'acqua (*Populion albae*), ed è specie diagnostica dei boschi paludosi con *Quercus robur*, *Ulmus*

minor ed *Alnus glutinosa*, propri dei substrati alluvionali fini con livello di falda mediamente elevato (Società Botanica Italiana 2013) Dal punto di vista conservazionistico, si tratta di comunità vegetali importanti in quanto presenti in forma relittuale e fortemente frammentate come conseguenza dell'antropizzazione. Gli habitat *sensu* direttiva 92/43 sono il 91F0 [Foreste miste riparie di grandi fiumi a *Quercus robur*, *Ulmus laevis* e *Ulmus minor*, *Fraxinus excelsior* o *Fraxinus angustifolia* (*Ulmion minoris*)] e 92A0 (foreste a galleria di *Salix alba* e *Populus alba*).

Aspetti genetici

Il frassino ossifillo è stato oggetto di un limitato numero di studi genetici, a differenza del frassino maggiore. Nell'ambito del progetto europeo FRAXIGEN sono stati osservati complessivamente 8 aplotipi nell'ambito di 34 popolazioni appartenenti all'Europa mediterranea ed orientale. Per quanto riguarda la situazione italiana, sono stati individuati almeno due aplotipi, uno più meridionale e l'altro settentrionale (con la pianura padana come possibile zona di compresenza), cui potrebbe essere aggiunto un terzo aplotipo individuato al confine tra Slovenia ed Italia. La maggior parte degli aplotipi è stata osservata nella penisola balcanica, suggerendo come tale area possa essere stata un rifugio glaciale della specie. Non è tuttavia possibile escludere che anche le penisole iberica ed italiana abbiano rappresentato altre zone di rifugio, stante la presenza di aplotipi assenti nei Balcani.

La differenziazione genetica tra popolamenti è risultata modesta, sia nell'ambito di popolamenti che si trovano nello stesso Paese (ad es., Grecia - Papi et al. 2012) che tra popolamenti appartenenti ad ambiti geografici più lontani. La situazione presenta quindi grandi analogie con quanto già evidenziato a proposito del frassino maggiore, quanto meno nel nostro paese (Ferrazzini et al. 2007).

Scopo del lavoro

Lo scopo dello studio è stato quello di analizzare la variabilità genetica presente nel frassino ossifillo nell'ambito dell'Italia nord-orientale. Il mutamento climatico attualmente in atto potrebbe infatti favorire la diffusione spontanea di specie tendenzialmente termofile (FRAXIGEN 2005), sebbene su tale previsione il dibattito sia tuttora aperto e non manchino opinioni contrastanti (Hemery et al. 2010). Le stesse attività selvicolturali, soprattutto se a prevalente finalità di ricostituzione naturalistica, potrebbero in futuro prevedere un maggior ricorso a specie caratte-

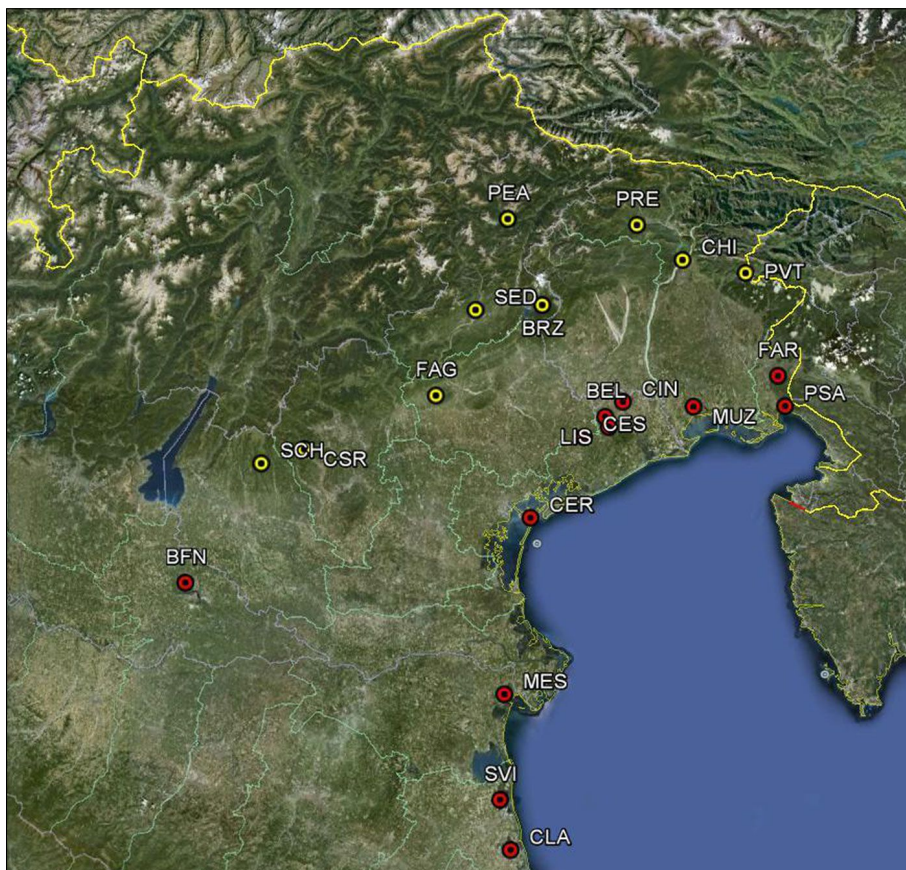


Fig. 2 - Localizzazione geografica delle popolazioni analizzate nel presente studio (in rosso: *Fraxinus angustifolia*; in giallo: *Fraxinus excelsior*).



Fig. 3 - Maestoso esemplare di frassino ossifillo a Belfiore (Pramaggiore, VE).

rizzate da più elevata tolleranza alle alte temperature. Il quadro complessivo viene reso ancor più complesso dalla recente diffusione del patogeno *Chalara fraxinea*, individuato in Italia nord-orientale a partire dal 2009 (Ogris et al. 2010) ed in grado di colpire tutte le specie italiane del genere *Fraxinus*. Gli effetti di tale fitopatia non sono tuttavia ancora del tutto chiari, sebbene le aree caratterizzate da climi freschi appaiono essere quelle più a rischio (Carrari 2013).

Nell'ambito del presente studio sono stati valutati 12 popolamenti mediante il ricorso a marcatori molecolari di tipo microsatellite (Tautz & Renz 1984). Sono anche stati approfonditi i rapporti intercorrenti tra la specie ed il frassino maggiore, cercando di evidenziare eventuali fenomeni di introgressione genetica tra le due specie. Infine, i risultati ottenuti sono stati discussi alla luce della Direttiva Europea 1999/105/CE, che si occupa dell'utilizzazione di materiali forestali di propagazione e stabilisce principi e criteri sui quali la filiera vivaistica deve basarsi. Tra questi uno degli aspetti più rilevanti è la definizione di Regioni di Provenienza, cioè aree caratterizzate da elevata omogeneità dei parametri ecologici e sulle quali si trovano popolazioni geneticamente omogenee (Belletti et al. 2010).

Fig. 4 - Giovani frassini ossifilli nel popolamento dell'Isola della Certosa (VE).



Materiali e metodi

I popolamenti oggetto di studio

Il lavoro ha preso in considerazione 12 popolamenti di frassino ossifillo (Fig. 2), sulla cui origine autoctona si può essere ragionevolmente certi. Cinque di tali popolamenti sono localizzati nell'ambito della Regione Veneto (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5), 3 in Friuli Venezia Giulia (Fig. 6), altrettanti in Emilia Romagna ed uno in Lombardia. Alcune caratteristiche geografiche dei popolamenti di frassino ossifillo oggetto di

studio sono riportate nella Tab. 2.

Si riportano di seguito alcune brevi caratteristiche ecologico-vegetazionali dei popolamenti studiati.

- BFN: quercu-carpineti della bassa pianura padana orientale.
- SVI, MES, CLA: pinete di pino domestico associate a quercu-carpineti.
- CER: isola della laguna veneziana in parte occupata dal complesso di edifici di una vecchia caserma abbandonata, attualmente in fase di recupero (bosco costiero dei suoli idrici).

Fig. 5 - Il popolamento dei Laghi di Cinto (Cinto Caomaggiore, VE).





Fig. 6 - Il popolamento di Palude Sablici (Doberdò del Lago, GO).

- CES: bosco misto caducifoglio tipico della pianura padano-veneta, con fustaia prevalentemente coetanea interessata da recenti interventi di diradamento e irrigazione al fine di migliorare il rinnovamento della farnia (quercono misto vegetante su falda sospesa).
 - BEL: relitto di bosco planiziale inserito all'interno di un parco storico (ulmo-frassineto).
 - LIS: relitto di bosco planiziale (quercono) parzialmente allagato in ambito di bassa pianura intensamente coltivata (querco-carpineto planiziale).
 - CIN: cave senili rinaturalizzate cui si associano boschi umidi e corsi d'acqua di origine sorgiva, lungo i quali si sviluppano fasce boscate e siepi campestri (saliceto di *Salix alba*, quercocarpineto planiziale, alneto di *Alnus glutinosa*).
 - MUZ, FAR: boschi umidi su substrati minerali dei terrazzi fluviali più evoluti.
 - PSA: bosco palustre su substrati torbosi o minerali con prolungata inondazione.
- Molti di tali popolamenti (BFN, MES, CLA, CER, LIS, MUZ e PSA) sono ufficialmente riconosciuti dalle competenti Amministrazioni Regionali quali fonte di semi certificati.
- Per meglio analizzare i rapporti esistenti tra il frassino ossifillo e quello maggiore, vengono riportati anche alcuni dati di analisi effettuate in precedenza su popolamenti di quest'ultima specie, presenti nella

Tab. 2 - Popolamenti di frassino ossifillo analizzati nello studio e loro localizzazione geografica.

Sigla	Popolamento (Comune)	Provincia	Lat. N	Long. E	Quota (m s.l.m.)
BFN	Bosco Fontana (Marmirolo)	Mantova	45° 12'	10° 45'	25
SVI	S. Vitale (Ravenna)	Ravenna	44° 30'	12° 14'	5
MES	Bosco della Mesola (Goro, Codigoro, Mesola)	Ferrara	44° 51'	12° 15'	2
CLA	Pineta Classe (Ravenna)	Ravenna	44° 20'	12° 17'	2
CER	Isola Certosa (Venezia)	Venezia	45° 26'	12° 22'	1
CES	Olmè (Cessalto)	Treviso	45° 42'	12° 37'	2
BEL	Belfiore (Pramaggiore)	Venezia	45° 47'	12° 43'	5
LIS	Lison (Portogruaro)	Venezia	45° 44'	12° 44'	1
CIN	Laghi di Cinto (Cinto Caomaggiore)	Venezia	45° 49'	12° 48'	9
MUZ	Muzzana (Muzzana del Turgnano)	Udine	45° 48'	13° 08'	10
FAR	Grotta (Farra di Isonzo)	Gorizia	45° 54'	13° 32'	30
PSA	Palude Sablici (Doberdò del Lago)	Gorizia	45° 48'	13° 34'	7

Tab. 3 - Popolamenti di frassino maggiore considerati nello studio e loro localizzazione geografica.

Sigla	Popolamento (Comune)	Provincia	Lat. N	Long. E	Quota (m s.l.m.)
SCH	Schivazzi-Campe-Croce (Velo Veronese)	Verona	45° 36'	11° 06'	950
CSR	Contrada Sorto (Valdagno)	Vicenza	45° 39'	11° 18'	740
FAG	Fagarè (Cornuda)	Treviso	45° 50'	11° 55'	200
SED	Sedico (Sedico)	Belluno	46° 07'	12° 06'	350
PEA	Paeai-Vinigo (Vodo di Cadore)	Belluno	46° 25'	12° 15'	1.000
BRZ	Broz (Tambre)	Belluno	46° 08'	12° 25'	1.020
PRE	Preone (Ampezzo)	Udine	46° 24'	12° 52'	1.000
CHI	Chianei (Trasaghis)	Udine	46° 17'	13° 05'	500
PVT	Ponte Vittorio (Taipana)	Udine	46° 15'	13° 30'	500

stessa area geografica. Alcune caratteristiche di tali popolamenti sono riportate nella Tab. 3 e in Fig. 2 (per ulteriori dettagli si veda Belletti et al. 2005, Monteleone et al. 2005, Ferrazzini et al. 2007)

Il campionamento

I campionamenti in bosco hanno coinvolto alcune foglie prelevate durante la stagione autunnale da non meno di 24 piante adulte per popolamento, sufficientemente distanziate tra di loro da rendere improbabili eventuali vincoli di parentela. Le piante campionate sono state ritenute appartenenti alla specie *Fraxinus angustifolia* sulla base di caratteri morfologici (numero e forma delle foglioline, colore delle gemme e, ove possibile, tipo di infiorescenza). Per alcuni popolamenti (SVI, MES, CES e MUZ) si è utilizzato direttamente il DNA già estratto, predisposto e fornito dal Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale del Corpo Fo-

restale dello Stato di Peri (Verona).

Analisi genetiche

Il DNA è stato estratto dal materiale campionato in bosco (foglie) mediante macerazione in azoto liquido ed utilizzo di specifici prodotti reperibili in commercio (nel caso specifico il QIAGEN® DNeasy plant mini kit), adottando le procedure suggerite dal produttore. Per ogni campione è stata ottenuta una concentrazione del DNA pari a 20 ng μl^{-1} .

L'analisi genetica è stata condotta analizzando 6 loci nucleari polimorfici scelti tra i 16 microsatelliti isolati da Brachet et al. (1999) e Lefort et al. (1999) per il frassino maggiore, in quanto polimorfici e caratterizzati da una buona risoluzione del loro *pattern* elettroforetico, nonché sulla base dei risultati reperiti in bibliografia (Heuertz et al. 2001, Morand et al. 2002, Heuertz et al. 2004). Le caratteristiche di tali marcatori sono riportate in Tab. 4.

Tab. 4 - Caratteristiche descrittive dei marcatori microsatelliti nucleari usati per lo studio. I marcatori FEM(SATL)11 e FEM(SATL)12 sono stati successivamente esclusi dalle analisi, a causa della scarsa risoluzione e ripetibilità delle bande da loro originate. (pb): paia di basi.

Microsatellite (nucleare)	Primer utilizzati	Sequenza ripetuta	Numero di alleli	Peso molecolare (range in pb)
FEM(SATL)04	5' -TTCATGCTTCTCCGTGTCTC-3' 5' -GCTGTTTCAGGCGTAATGTG-3'	(CA) _n (AG) _m	14	154-186
FEM(SATL)10	5' -TTGAGCAACATGTAATTATG-3' 5' -AAATATCCGGTGCTTGTGTA-3'	(CT) _n	67	154-410
FEM(SATL)11	5' -GATAGCACTATGAACACAGC-3' 5' -TTCTTGAAGTAGTAGAACTA-3'	(GA) _n (TA) _m	-	-
FEM(SATL)12	5' -TTTTTGGAAACCCTTGATTT-3' 5' -ATTAAGAATGCCCGTCCATC-3'	(GA) _n CA(GA) _m	-	-
FEM(SATL)16	5' -TTTAAACAGTTAACTCCCTTC-3' 5' -CAACATACAGCTACTAATCA-3'	(CA) _n CG(CA) _m	13	176-230
FEM(SATL)19	5' -CTGTTCAATCAAAGATCTCA-3' 5' -TGCTCGCATATGTGCAGATA-3'	(CA) _n CGGC(CA) _m	19	142-200
Media	-	-	28,25	-

La reazione polimerasica è stata effettuata modificando il protocollo descritto in Brachet et al. (1999) e Lefort et al. (1999). In particolare, l'amplificazione del DNA è avvenuta utilizzando la seguente miscela di reazione: *reaction buffer* 1X, cloruro di magnesio 2.5 mM, dNTPs mix 0.2 mM, *primer forward* 0.2 μ M, *primer reverse* 0.2 μ M, Taq Polimerasi (Promega) 1 U, DNA campione 20 ng, H₂O bidistillata sterile quanto basta per giungere a un volume finale di 25 μ l.

Le reazioni PCR sono state condotte in un termociclatore Perkin Elmer GeneAmp® PCR System 9600, adottando i seguenti cicli di reazione: fase iniziale di 5 minuti a 96 °C; 30-35 cicli composti da 1 minuto a 94 °C (denaturazione del DNA), 1 minuto a 52 °C (*annealing*, cioè aggancio dei primer sul DNA campione), 2 minuti a 72 °C (sintesi del DNA); fase finale di 10 minuti a 72 °C.

La sequenza *forward* di ciascuna coppia di primer è stata marcata con un colorante fluorescente nel suo terminale 5' (M-Medical S.r.l. e MWG-Biotech AG): IR-Dye 700 e, in alternativa, IR-Dye 800.

I prodotti di reazione sono stati separati elettroforicamente dopo opportuna diluizione e denaturazione a 96 °C. L'elettroforesi è stata effettuata su gel di poliacrilamide denaturante (6.5%) utilizzando un sequenziatore (DNA 4200 Sequencer - LI-COR Biotechnology). Le corse elettroforetiche sono state condotte a 2000 V per 2 ore in TBE *buffer* 1X.

La determinazione dei polimorfismi è stata ottenuta attraverso il confronto del peso delle bande di DNA con quelle di uno standard marcato (IR-Dye 700 e IR-Dye 800) a peso molecolare noto (50-350 bp) e l'uso del *software* e-Seq (*DNA Sequencing and Analysis Software*).

Elaborazione dei dati

L'analisi della variabilità genetica dei popolamenti è stata effettuata attraverso una serie di parametri: le frequenze alleliche e i valori di eterozigosi sono stati calcolati ricorrendo al *software* GENALEX versione 6 (Peakall & Smouse 2006). I valori di eterozigosi sono stati stimati seguendo i suggerimenti di Nei (1987). La struttura e la distribuzione della variabilità genetica dei popolamenti sono state stimate attraverso la statistica F di Wright (1921, 1969), applicando il metodo riportato da Weir & Cockerham (1984). La variabilità genetica totale è stata scomposta nelle sue componenti tra popolamenti e interna ai popolamenti. Le matrici delle distanze genetiche (Nei 1972) sono state calcolate tramite il *software* GENDIST 3.6 e poi utilizzate per costruire il dendrogramma UPGMA attraverso il *software* NEIGHBOR 3.6 (Felsen-

stein 2004). Anche l'analisi delle coordinate principali è stata condotta sulle matrici delle distanze genetiche, utilizzando i pacchetti statistici DCENTER e EIGEN del *software* NTSYS (Rohlf 2001). È infine stato utilizzato anche il *software* STRUCTURE (Pritchard et al. 2000), il quale definisce il numero ottimale di raggruppamenti nell'ambito del materiale in analisi, indipendentemente dalla loro origine, e calcola per ciascun individuo analizzato la percentuale di probabilità di appartenenza ai vari gruppi.

Risultati

Variabilità dei marcatori microsatellite

L'analisi genetica condotta in laboratorio sulla variabilità riscontrata a livello dei marcatori oggetto di studio ha consentito di identificare numerose varianti alleliche. Sono state evidenziate 113 bande, distribuite tra i quattro microsatelliti nucleari che hanno fornito risultati leggibili (Tab. 4). Da notare che, nel caso degli altri due marcatori (FEM11 e FEM12), non è invece stato possibile ottenere risultati sufficientemente chiari e ripetibili, per cui i dati ad essi relativi non sono stati considerati ai fini delle successive elaborazioni statistiche.

Sono stati evidenziati 38 alleli privati, cioè varianti geniche che sono presenti in un unico popolamento e che quindi rivestono una significativa importanza ai fini della definizione dei livelli di biodiversità presenti nell'ambito del materiale in esame. Il popolamento che ha presentato il maggior numero di alleli privati è risultato FAR con 10 alleli privati, seguito da MES con 7. All'opposto, CLA e SVI hanno evidenziato la presenza di un solo allele privato, mentre a CES e LIS non ne sono stati individuati del tutto.

Variabilità genetica interna ai popolamenti

I valori di variabilità genetica interni alle popolazioni sono riportati nella Tab. 5, dove N indica il numero medio di alleli per locus, N_e il numero effettivo di alleli per locus (parametro che, a differenza di quello precedente, tiene conto anche della frequenza con cui ciascuna variante allelica è presente), H_o l'eterozigosi osservata, H_e l'eterozigosi attesa (quella calcolata ipotizzando che le popolazioni si trovino in equilibrio di Hardy-Weinberg), F_{IS} l'indice di fissazione (che indica l'eccesso - valori positivi - oppure la carenza - valori negativi - di omozigoti). H_e rappresenta anche la probabilità che due alleli scelti casualmente nell'ambito di una popolazione siano diversi.

Dai dati della tabella si evidenzia come i popola-

Tab. 5 - Valori di ricchezza allelica e di diversità genetica nell'ambito delle 12 popolazioni di frassino ossifillo oggetto di analisi. (N): numero medio di alleli per locus; (N_e): numero effettivo di alleli per locus, (H_o): eterozigosi osservata; (H_e): eterozigosi attesa; (F_{IS}): indice di fissazione

Popolamento	N	N_e	H_o	H_e	F_{IS}
BFN - Bosco Fontana	8.00	4.36	0.583	0.586	0.005
SVI - S. Vitale	6.75	4.33	0.719	0.704	- 0.021
MES - Bosco della Mesola	6.00	2.79	0.488	0.556	0.122
CLA - Pineta Classe	4.50	3.25	0.688	0.576	- 0.194
CER - Isola Certosa	7.75	4.76	0.563	0.588	0.043
CES - Olmè	5.25	3.73	0.673	0.627	- 0.073
BEL - Belfiore	6.50	4.11	0.688	0.630	- 0.092
LIS - Lison	6.25	4.95	0.479	0.541	0.115
CIN - Laghi di Cinto	9.00	5.81	0.667	0.632	- 0.55
MUZ - Muzzana	7.00	2.53	0.583	0.527	- 0.106
FAR - Grotta	10.00	6.24	0.611	0.770	0.206
PSA - Palude Sablici	8.00	5.65	0.554	0.622	0.109
MEDIA	7.08	4.37	0.608	0.613	0.008
(dev. standard)	(0.77)	(0.51)	(0.043)	(0.038)	(0.054)

menti presentano valori di ricchezza allelica molto differenti: in particolare, FAR, CIN, BFN e PSA hanno manifestato la più elevata ricchezza allelica, mentre, al contrario, MES, CES, CLA e MUZ hanno presentato i valori più ridotti di variabilità genetica interna al popolamento. Per quanto riguarda invece il livello di eterozigosi i valori più alti sono stati trovati a FAR e SVI, mentre quelli inferiori a LIS e MUZ. L'indice di fissazione è risultato mediamente prossimo a zero, denotando così un generale rispetto dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Differenziazione genetica tra i popolamenti

Per quanto riguarda la differenziazione genetica tra i popolamenti (H_T), è stato riscontrato un valore totale pari a 0.684; poiché la componente di tale variabilità dovuta a differenze interne alle popolazioni (H_S) è stata stimata in 0.613, ne consegue un livello di divergenza tra di esse (D_{ST}) di 0.071, equivalente a un grado di differenziazione genetica (G_{ST}) di 0.102. In

altre parole, di tutta la variabilità genetica che è stata identificata, poco più del 10% è dovuta a differenze tra popolamenti. A risultati analoghi si può pervenire analizzando i valori dei parametri F di Wright: anche in questo caso F_{IT} rappresenta una stima della variabilità genetica totale (0.096), F_{IS} di quella interna ai popolamenti (0.002) e F_{ST} il peso della componente di variabilità tra popolamenti rapportata al totale (0.102).

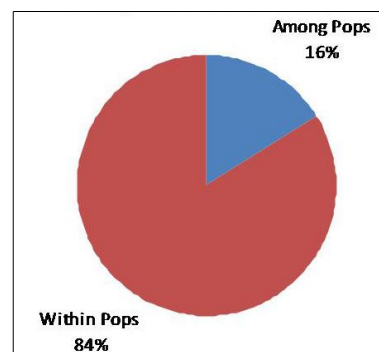
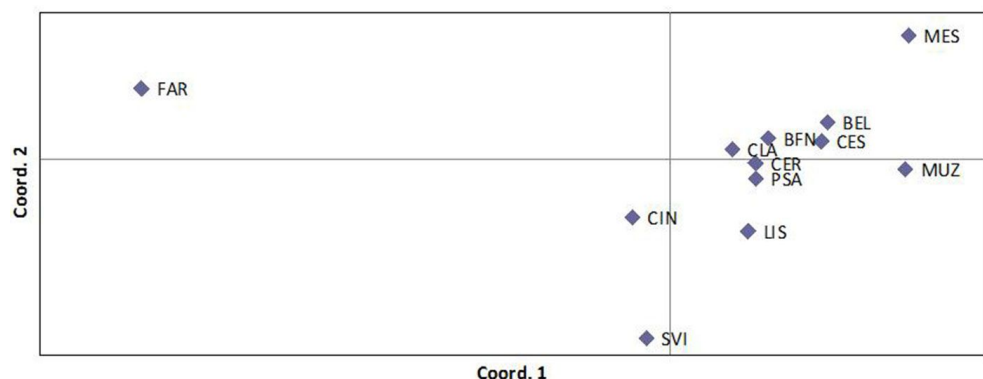


Fig. 7 - Risultati dell'AMOVA tra i popolamenti di frassino ossifillo oggetto di studio.

Fig. 8 - Risultati dell'analisi delle coordinate principali relativa ai 12 popolamenti di frassino ossifillo analizzati nello studio e basati sulla variazione presentata a 4 loci microsatellite.



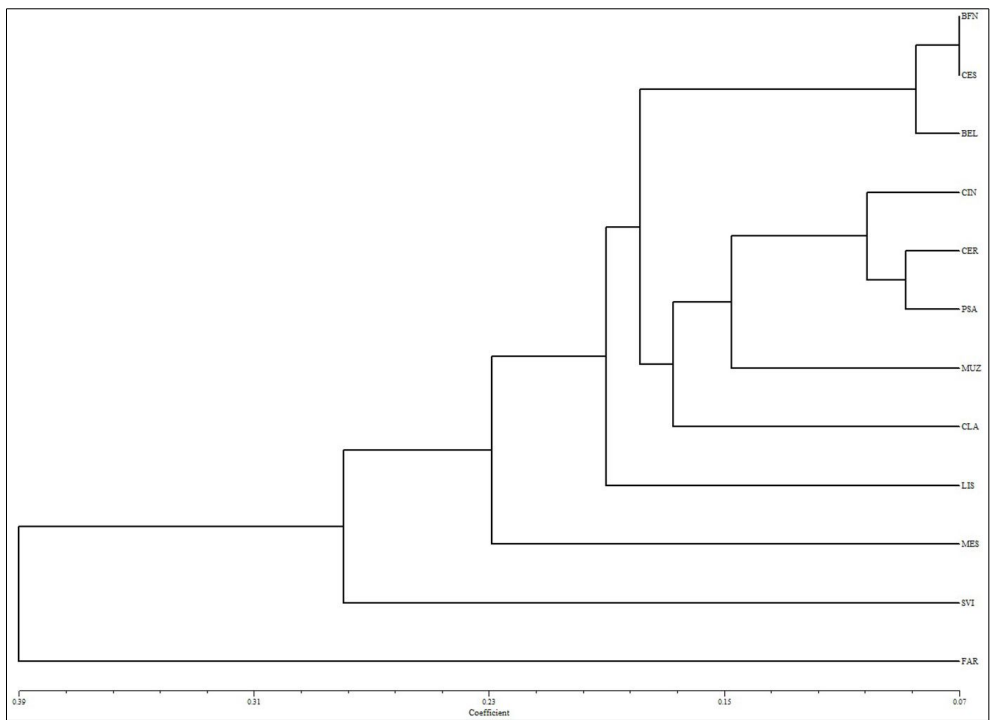


Fig. 9 - Dendrogramma costruito sulla base delle distanze genetiche tra le popolazioni oggetto di studio.

Una conferma sulla presenza di una consistente quota di variabilità genetica che si colloca tra i popolamenti deriva dall'AMOVA (Analisi della Varianza Molecolare), la quale prevede un peso di quest'ulti-

ma addittura superiore rispetto ai casi precedenti (Fig. 7).

La distribuzione della variabilità genetica è stata valutata attraverso distinte metodiche. La prima è

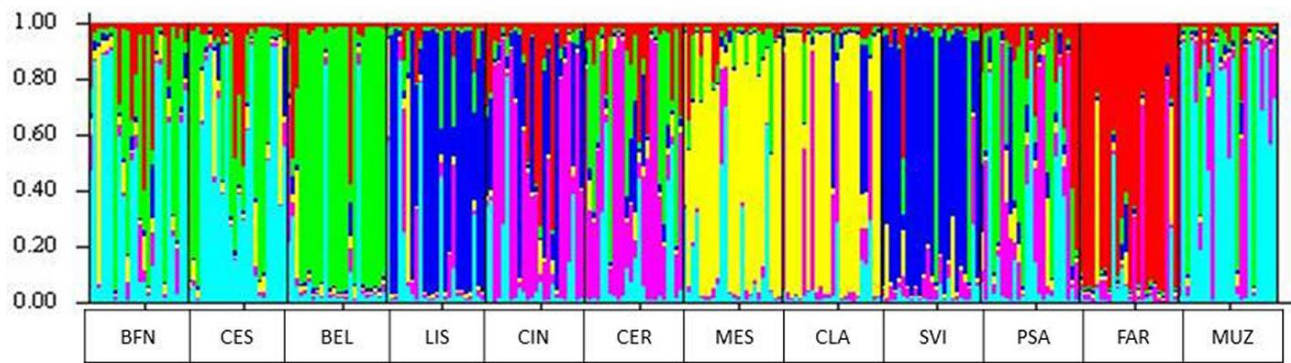


Fig. 10 - Risultati dell'analisi STRUCTURE effettuata sui 12 popolamenti di frassino ossifillo (K = 6).

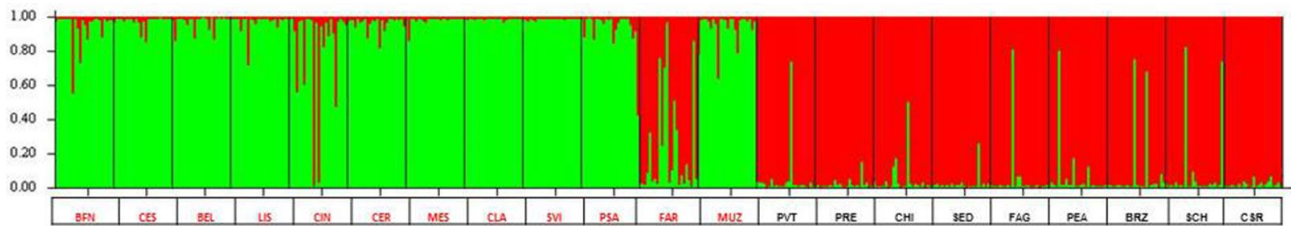


Fig. 11 - Risultati dell'analisi STRUCTURE relativamente a 12 popolamenti di frassino ossifillo e 9 di frassino maggiore dell'Italia nord-orientale. Il colore verde indica il pool genetico riconducibile alla specie *Fraxinus angustifolia*, quello rosso a *F. excelsior*.

quella che prevede l'Analisi delle Coordinate Principali (PCoA), la quale raggruppa i popolamenti in base alle loro distanze genetiche. I risultati della PCoA sono riportati nella Fig. 8. Come si può notare, la situazione più evidente riguarda il popolamento friulano FAR, che è risultato nettamente differenziato da tutti gli altri. Questi sono invece risultati sostanzialmente simili e comunque non raggruppabili in funzione della loro localizzazione geografica. Ad esempio, i tre popolamenti emiliani si distribuiscono in modo irregolare nell'ambito della nuvola di popolamenti che si trova nella parte destra del grafico. All'opposto, i popolamenti di BEL, LIS e CIN, geograficamente molto vicini, non risultano geneticamente più simili rispetto agli altri.

A risultati molto simili si perviene osservando il dendrogramma costruito sulla base delle distanze genetiche calcolate tra coppie di popolazioni (Fig. 9): anche in questo caso è evidente la netta differenziazione tra il popolamento di Grotta (FAR) e gli altri, nell'ambito dei quali invece non si ravvisano andamenti particolari.

Dall'analisi STRUCTURE applicata alle popolazioni di frassino ossifillo è emerso come il numero ottimale di raggruppamenti genetici sia pari a 6. I vari individui si distribuiscono nell'ambito di tali gruppi come rappresentato in Fig. 10. Dalla figura emerge una situazione abbastanza confusa e poco correlata con parametri di natura geografica. Il popolamento lombardo (BFN), ad esempio, risulta simile a quello veneto di CES, ma anche a quello friulano di MUZ. Mentre FAR conferma la sua particolarità, i popolamenti veneti CIN e CER, presentano una certa similitudine, così come LIS con SVI e MES con CLA. Di più difficile definizione PSA, che presenta una situazione molto più complessa.

Confronto tra Fraxinus angustifolia e F. excelsior

Per quanto riguarda le possibili interazioni genetiche tra le due specie di *Fraxinus* maggiormente diffuse nell'Italia settentrionale, appare significativo il risultato ottenuto elaborando i dati tramite la procedura STRUCTURE (Fig. 11). Dalla figura si evidenzia subito come le due specie risultino divise in modo abbastanza netto. L'eccezione più vistosa è quella del popolamento di Grotta (FAR), il quale, pur essendo originariamente stato identificato (e soprattutto campionato) come frassino ossifillo, presenta caratteristiche genetiche in gran parte riconducibili al frassino maggiore. Un certo numero di individui con caratteristiche intermedie si trovano anche in altri popolamenti, soprattutto BFN e CIN.

Discussione e conclusioni

Il lavoro svolto ha consentito di approfondire le conoscenze sulle caratteristiche genetiche dei popolamenti di *Fraxinus angustifolia* dell'Italia nord-orientale e permette di trarre indicazioni che rivestono una certa significatività anche dal punto di vista pratico-applicativo. In particolare, si fa riferimento all'applicazione delle norme previste dal Decreto Legislativo 386/03, che recepisce la Direttiva CEE 105/1999 ed impone la certificazione del materiale forestale di propagazione. In dettaglio, la norma prevede l'istituzione delle Regioni di Provenienza, definite come "il territorio o l'insieme di territori soggetti a condizioni ecologiche sufficientemente uniformi e sui quali si trovano sovrassuoli o fonti di semi sufficientemente omogenei dal punto di vista fenotipico e, ove valutato, dal punto di vista genotipico, tenendo conto dei limiti altimetrici ove appropriato" (art. 2, lettera g, D. Lgs 386/03). Nella definizione delle Regioni di Provenienza occorre tenere conto sia dei fattori di tipo ecologico in senso lato (climatici, pedologici, vegetazionali, ecc.) che di quelli genetici propri dei popolamenti che crescono spontaneamente nelle aree in esame (Belletti et al. 2010, Camerano et al. 2011).

Come verificato per la maggior parte delle specie forestali (Hamrick et al. 1992), anche le popolazioni esaminate hanno presentato elevati livelli di variabilità genetica. Tuttavia, in un analogo studio effettuato in Grecia (Papi et al. 2012), si sono riscontrati valori di diversità genetica leggermente superiori: tale fatto può essere spiegato con la maggior dimensione dell'area di studio (che ha coinvolto l'intera penisola ellenica) e con una maggior prossimità di questa all'area balcanica, ritenuta la principale area di rifugio della specie durante l'ultima epoca glaciale (FRAXIGEN 2005). Va tuttavia ricordato come alcuni autori propongano anche le penisole iberica ed italiana quali possibili aree di rifugio, dal momento che vi sono stati identificati aplotipi di microsatelliti plastidiali praticamente assenti nell'area balcanica (FRAXIGEN 2005). Va inoltre tenuto presente che taluni parametri ricavati nel presente studio potrebbero essere influenzati da fenomeni di introgressione genetica tra il frassino ossifillo e quello maggiore: l'esempio più evidente è rappresentato dal popolamento di FAR, laddove gli elevati valori di alleli privati, ricchezza allelica ed eterozigosi sono probabilmente dovuti a una consistente percentuale di incrocio tra le due specie.

In linea generale, i popolamenti esaminati hanno presentato un buon accordo con i dati attesi sulla base della legge di Hardy-Weinberg (indice di fissazio-

ne medio 0.008). Tuttavia, se analizziamo i valori che si riferiscono ai singoli popolamenti, la situazione diventa eterogenea: è infatti possibile identificare situazioni di evidente eccesso di omozigoti (MES, LIS e i due popolamenti friulani: FAR e PSA) ed altre in cui invece è presente un numero di eterozigoti superiore a quello atteso (CLA, CES, BEL e MUZ). L'eccesso di omozigosi si può spiegare in diversi modi: presenza di alleli nulli (che inducono un'errata interpretazione di individui eterozigoti come omozigoti), effetto della strutturazione del popolamento in gruppi all'interno del quale l'incrocio risulta più probabile (effetto Wahlund). Tuttavia la causa più comune per spiegare l'eccesso di omozigoti è la presenza di *inbreeding* (incroci tra individui imparentati o addirittura di autofecondazione), che tende a rendere più probabile la comparsa di un genotipo omozigote rispetto alle unioni casuali. Nel citato studio di Papi et al. (2012) effettuato in 8 popolamenti di frassino ossifillo in Grecia, è stato stimato un tasso di autofecondazione pari a 0.157. A sua volta, l'*inbreeding* molto spesso dipende da un basso numero di individui che costituiscono la popolazione, tra i quali forzatamente si instaurano vincoli di parentela più stretti. In specie allogame come il frassino ossifillo, l'eccesso di omozigosi è un fattore negativo, che indebolisce le popolazioni, innescando anche fenomeni di erosione genetica (depressione da *inbreeding*). Di conseguenza, un popolamento caratterizzato da un indice di fissazione significativamente positivo dovrebbe essere valutato con grande cautela nell'ottica di una destinazione alla produzione di materiale propagativo.

La distribuzione della variabilità genetica, pur essendo significativa la differenziazione tra di essi (G_{ST} e F_{ST} entrambi pari a 0.102), non è risultata correlabile ad alcun fattore geografico. Tale fatto può spiegarsi con la relativa esiguità dell'area considerata e con l'assenza di barriere (quali catene montuose) in grado di limitare il flusso genico tra di esse.

Benché i *pool* genici del frassino ossifillo e del frassino maggiore siano risultati distinti, alcuni individui hanno presentato caratteristiche genetiche intermedie: tale fenomeno è risultato evidente soprattutto a FAR, dove la maggior parte degli individui campionati è risultata più o meno simile al frassino maggiore. La spiegazione di ciò può derivare dal fatto che il popolamento cresce ai margini dell'areale di diffusione delle due specie, quindi in una situazione ove la loro compresenza è molto comune. Di conseguenza, fenomeni di ibridazione possono risultare più frequenti rispetto ad altre situazioni. A conferma di ciò, va detto che i frassini del popolamento in esa-

me presentano anche caratteristiche morfologiche non del tutto chiare, che spesso creano notevoli difficoltà di definizione della specie (Pier Paolo Merluzzi, comunicazione personale). Individui originati da incrocio potrebbero anche essere presenti, sia pure con frequenza molto minore, in altri popolamenti: CIN in particolare, ma anche BFN (ove in effetti la diffusione del frassino maggiore è più consistente) e in misura ancora inferiore tutti gli altri popolamenti del Veneto e del Friuli Venezia Giulia. Al contrario, i popolamenti emiliano-romagnoli (MES, CLA e SVI) sembrano risentire in misura del tutto trascurabile di possibili introgressioni genetiche da parte del frassino maggiore: risultato spiegabile con la presenza sporadica di questa specie in tali aree.

La presenza di individui presumibilmente derivati da incrocio tra le due specie deve essere tenuta in grande rilievo nel caso in cui si proceda alla raccolta di materiale propagativo. Se infatti lo scopo è quello di ottenere materiale sicuramente riconducibile al frassino ossifillo, i popolamenti in questione dovranno essere evitati. D'altra parte, si può anche escludere che l'eventuale introgressione di geni provenienti dal frassino maggiore possa migliorare l'adattabilità del frassino ossifillo. Quest'ultima specie, infatti, è più termofila e in una prospettiva di cambiamenti climatici caratterizzati da un incremento delle temperature medie i fenomeni di incrocio potrebbero addirittura risultare controproducenti.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato svolto con il contributo finanziario della Regione Veneto, Direzione Economia e Sviluppo Montano. Si ringrazia il Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale del Corpo Forestale dello Stato di Peri (Verona), per la cessione del DNA relativo a quattro dei popolamenti di frassino ossifillo esaminati. Si ringraziano inoltre i dott. Daniele Savio e Pier Paolo Merluzzi per le informazioni fornite e per il supporto garantito durante alcune fasi di campionamento

Bibliografia

- Aeschmann D, Lauber K, Moser DM, Theurillat JP (2004). Flora alpina 2. Zanichelli, Bologna, pp. 1188.
- Belletti P, Monteleone I, Ferrazzini D, Camerano P, Grieco C (2005). Individuazione di aree forestali geneticamente omogenee per la produzione di seme di elevata qualità: il frassino maggiore. Rapporti 58/2005, APAT, Roma, pp. 168.
- Belletti P, Camerano P, Pignatti G (2010). Regioni di Provenienza in Italia. Sherwood 166: 21-25.

- Bernetti G (1998). Selvicoltura speciale. UTET, Torino, pp. 416.
- Brachet S, Jubier MF, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N (1999). Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior* L. *Molecular Ecology* 8: 160-163.
- Camerano P, Belletti P, Ferrazzini D, Pignatti G (2011). Definizione di Regioni di Provenienza per le specie forestali: a che punto siamo? *Sherwood* 179: 23-27.
- Carrari E (2013). Boschi di frassino a rischio: arriva un patogeno alieno. Aboutplants.eu, web site. [online] URL: <http://www.aboutplants.eu/portal/cms/content-fitopatologia/270-boschi-di-frassino-a-rischio-arriva-un-patogeno-alieno.html>
- Hemery GE, Clark JR, Aldinger E, Claessens H, Malvolti ME, O'Connor E, Raftoyannis Y, Savill PS, Brus R (2010). Growing scattered broadleaved tree species in Europe in a changing climate: a review of risks and opportunities. *Forestry* 83: 65-81. - doi: [10.1093/forestry/cpp034](https://doi.org/10.1093/forestry/cpp034)
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* 113: 351-365. - doi: [10.1016/S0006-3207\(03\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00122-8)
- Felsenstein J (2004). PHYLIP: phylogeny inference package (version 3.6). Web site. [online] URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/doc/main.html>
- Fernandez-Manjarres JF, Gerard PR, Dufour J, Raquin C, Frascaria-Lacoste N (2006). Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia* (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15: 3245-3257. - doi: [10.1111/j.1365-294X.2006.02975.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02975.x)
- Ferrazzini D, Monteleone I, Belletti P (2007). Genetic variability in populations of common ash from Northwestern Italy. *Annals of Forest Science* 64: 1-10. - doi: [10.1051/forest:2006100](https://doi.org/10.1051/forest:2006100)
- FRAXIGEN (2005). Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK, pp. 128.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124. - doi: [10.1007/BF00120641](https://doi.org/10.1007/BF00120641)
- Heuertz M, Hausman JF, Tsvetkov I, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2001). Assessment of genetic structure with and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology* 10: 1615-1623. - doi: [10.1046/j.1365-294X.2001.01300.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01300.x)
- Heuertz M, Hausman JF, Hardy OJ, Vendramin GG, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution* 58: 976-988.
- Jeandroz S, Frascaria-Lacoste N, Bousquet J (1996). Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. *Forest Genetics* 3: 237-242.
- Jump AP, Peñuelas J (2006). Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 103: 8096-8100. - doi: [10.1073/pnas.0510127103](https://doi.org/10.1073/pnas.0510127103)
- Kramer AT, Havens K (2009). Plant conservation genetics in a changing world. In: "Special Issue: Plant Science Research in Botanic Gardens" (Crane PR, Hopper SD, Raven PH, Stevenson DW eds). *Trends in Plant Science* 14 (11): 599-607. - doi: [10.1016/j.tplants.2009.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.005)
- Lefort F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC (1999). Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olives family. *Molecular Ecology* 8: 1088-1090. - doi: [10.1046/j.1365-294X.1999.00655_8.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00655_8.x)
- Leonardi S, Piovani P, Scalfi M, Piotti A, Giannini R, Menozzi P (2012). Effect of habitat fragmentation on the genetic diversity and structure of peripheral populations of beech in central Italy. *Journal of Heredity* 103: 408-417. - doi: [10.1093/jhered/ess004](https://doi.org/10.1093/jhered/ess004)
- Monteleone I, Ferrazzini D, Camerano P, Grieco C, Piotta B, Belletti P (2005). Regioni di provenienza per il frassino maggiore. *Sherwood* 115: 5-10.
- Morand ME, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002). A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology* 11: 377-385. - doi: [10.1046/j.1365-294X.2002.01461.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01461.x)
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *American Nature* 106: 282-292. - doi: [10.1086/282771](https://doi.org/10.1086/282771)
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA, pp. 512.
- Ogris N, Hauptman T, Floreancig V, Marsich F, Montecchio L (2010). First report of *Chalara fraxinea* on common ash in Italy. *Plant Disease* 1: 133.
- Papi RN, Spanos KA, Kyriakidis DA (2012). Genetic variation of *Fraxinus angustifolia* natural populations in Greece based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *European Journal of Forest Research* 131: 1151-1161. - doi: [10.1007/s10342-011-0586-1](https://doi.org/10.1007/s10342-011-0586-1)
- Pautasso M (2009). Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspectives in Plant Ecology* 11: 157-189. - doi: [10.1016/j.ppees.2009.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ppees.2009.01.003)
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. - doi: [10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x)
- Pignatti S (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna, pp.

- 2324.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rameau JC, Mansion D, Dume G (1989). Flore forestière Française. Volume 1: Plaines et collines, Tome 1, Institut Pour Le Développement Forestier, Paris, France, pp. 1794.
- Reich PB, Oleksyn J (2008). Climate warming will reduce growth and survival of Scots pine except in the far north. *Ecology Letters* 11: 588-597. - doi: [10.1111/j.1461-0248.2008.01172.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01172.x)
- Rohlf FJ (2001). NTSYS-pc: numeral taxonomy and multivariate analysis system (version 2.10j). Exeter Publications, New York, USA, pp. 44.
- Società Botanica Italiana (2013). Prodromo della vegetazione italiana. Web site. [online] URL: <http://www.prodromo-vegetazione-italia.org>
- Tasinazzo S, Dal Lago A (1999). Alberi ed arbusti dei Colli Berici. Tip. Ed. ESCA, Vicenza, pp. 175.
- Tautz D, Renz M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* 12: 4127-4138. - doi: [10.1093/nar/12.10.4127](https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127)
- Tessier du Cros E, Màyàs C, Kriebel H (1999). Contribution of genetics to the sustained management of global forest resources - Conclusions and recommendations. In: "Forest Genetics and Sustainability, Forestry Sciences" (Màyàs C ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, vol. 63, pp. 281-287.
- Väli U, Einarsson A, Waits L, Ellegren H (2008). To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology* 17:3808-3817. - doi: [10.1111/j.1365-294X.2008.03876.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03876.x)
- Wallander E, Albert VA (2000). Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany* 87: 1827-1841. - doi: [10.2307/2656836](https://doi.org/10.2307/2656836)
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370. - doi: [10.2307/2408641](https://doi.org/10.2307/2408641)
- Wright S (1921). Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright S (1969). Evolution and the genetics of populations, the theory of gene frequency. University of Chicago Press, Chicago, USA, vol. 2, pp. 758-760.