



**Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura,
le Foreste, la Natura e l'Energia**

DAFNE

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze e tecnologie per la gestione forestale e ambientale - XXV CICLO

**Analisi spaziali in studi di sostenibilità e conservazione
di risorse agrarie e forestali**

(AGR/10)

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Francesca Chiocchini

Coordinatore del corso

Prof.ssa Rosanna Bellarosa

Tutore

Prof.ssa Maria Nicolina Ripa

Co-tutore

Dott. Marco Lauteri

Anno Accademico 2012/2013

Ai miei figli Costanza, Claudia, Camilla e Filippo

INDICE

ABSTRACT	pag.1
RIASSUNTO	pag.4
1. Introduzione	pag.7
2. Primo caso di studio - Analisi spaziali nel “Progetto per l’implementazione di filiere integrate alimentari e bioenergetiche sostenibili nello stato amazzonico del Parà”	pag.11
2.1 Introduzione	pag.11
2.1 Sito d’intervento	pag.13
2.2 Materiali e metodi	pag.15
2.3 Risultati	pag.17
2.4 Discussione	pag.26
3. Secondo caso di studio - Analisi spaziali nella linea di ricerca “Biodiversità ed evoluzione dei popolamenti naturali di <i>Castanea sativa</i> in Europa”	pag.28
3.1 Introduzione	pag.28
3.2 Materiali e metodi	pag.30
3.3 Risultati	pag.35
3.3.1 Popolazioni Europee di <i>C. sativa</i>	pag.35
3.3.2 Popolazioni Bulgare di <i>C. sativa</i>	pag.40
3.4 Discussione	pag.43
4. Terzo caso di Studio: Analisi spaziali nella linea di ricerca “WA.L.NET - Walnut <i>Landscape genetics</i> in Eurasia”	pag.46
4.1 Introduzione	pag.46
4.2 Materiali e metodi	pag.48

4.3 Risultati	pag.56
4.4 Discussione	pag.63
5. Quarto caso di studio: Analisi spaziali per la tracciabilità dell'origine geografica di oli extravergini di oliva	pag.66
5.1 Introduzione	pag.66
5.2 Materiali e metodi	pag.68
5.3 Risultati	pag.70
5.4 Discussione	pag.72
6. Conclusioni e considerazioni generali	pag.73
7. Bibliografia	pag.75
Ringraziamenti	pag.88
Allegati	pag.89

ABSTRACT

Rapid growth of human pressure on natural resources has led profound changes in the natural environment. Destruction and degradation of natural habitats are widespread and profound and their implications for the conservation of biological diversity and the sustainability of natural resources are of global significance. Survival and spread of many species, and even of entire biomes, are seriously at risk for the rapidity of global warming, deforestation, land use changes and human activities.

Remnants of the natural environment increasingly occur as a mosaic of large and small patches, survivors of environments that have been carved up to develop new forms of productive land use for humans.

Many species have suffered local extinctions due to fragmentation and loss of natural habitats, while their ability to expand and re-colonize is hampered by the low degree of connectivity between the landscape fragments. Biodiversity conservation depends, therefore, by the maintenance of functional ecological networks and by the specific capacity of adaptation in fragmented habitats. Initiatives aimed at sustainability and agricultural and forestry resources preservation are needed to slow down biodiversity loss and to restore habitat connectivity.

The need to understand the complex interactions between biological, physical and socio-cultural components that have produced the current landscape, has stimulated the development of interdisciplinary methods, which consider the landscape, and all the variables associated with it, as a fundamental element of analysis.

Research in the field of landscape ecology has improved understanding of both the causes and the consequences of spatial heterogeneity, and how these vary with scale, coming to an effective influence on management of both natural and man-shaped landscapes. GIS spatial analysis functions are now essential to investigate the spatial nature of biological, physical and anthropic landscape components and their relationships. These are the tools of the trade of fundamental analysis in studies of sustainability and conservation of natural resources.

The aim of this thesis was to investigate the potential application of spatial analysis in four case studies, exploring the possibility to integrate data and methods from various disciplines, such as ecology and ecophysiology, population genetics and landscape analysis through the use of GIS spatial analysis tools. The thesis is the result of an interdisciplinary research involving working groups in plant eco-physiology, physiology of stable isotopes and population genetics.

The first case study focuses on the conservation and sustainability of Amazonian natural resources in the municipality of Moju (Pará, Brazil), where a fast development of human activity caused rapid deforestation in the last decades. Deforestation is associated to various determinants: the expansion of the urban area of Moju; the spread of an extensive primary and secondary road network; the expansion of cropland, palm oil plantations and cattle ranching. As a whole, it results in high fragmentation of primary forest in this area.

Several techniques have been adopted and integrated: remote sensing and spatial analysis to estimate deforestation; land cover and land use analysis to estimate carbon sequestration capability of a sample site; landscape ecology methods for the identification of spatial patterns of landscape structure; strategies for forest restoration.

Results show an increase in deforestation by 6% between 2001 and 2008, but a slight decrease in deforestation rate, annual forest loss amounting to 90-100 km², with a deforested area greater than 40% of the municipal area in 2008.

Main spatial patterns, observed in year 2008 images, of different shape and size, witness profound changes in land use through 1984-2008. Variation of NDVI values (*Normalized Difference Vegetation Index*) observed between 1984 and 2008, shows forest degradation and fragmentation highlighting the expansion of inhabited areas.

In Moju region human activity has grown strongly over the past few decades, leaving the country in a state of degradation and fragmentation, thus putting in serious crisis the ecological network functionality. Land cover and land use analysis on a 7700ha sample site, complemented with data from the literature, estimate a carbon stock amounting to 0.65 million tons. This stock would potentially double in an intact territory.

A recovery and conversion model has been proposed to cope with these emergencies, according to the so-called *legal reserve* (federal Brazilian law for the recovery of secondary forests), on an enterprise scale. Such a conversion would stimulate the restoration of ecosystem functions essential to the resettlement of the forest itself and the spontaneous recovery of its biodiversity, resulting in the gradual consolidation of the local ecological network.

The second and the third case study investigate the origin and the processes that have affected the current distribution of *Castanea sativa* in Europe, and *Juglans regia* in Asia, through the analysis of the spatial structure and genetic diversity of existing populations, in relation to landscape and environmental variables. The aim is to apply *landscape genetics*, combining data and methods of landscape ecology and population genetics to understand the spatial genetic structure of populations and the effects of the landscape matrix on gene flow and genetic variability.

The *overlay technique*, identifies the main clusters of populations (genetic structure), barriers and genetic discontinuities, and interpolates genetic variables to construct genetic isolines, allowing the identification of coincidences between topographical discontinuity and genetic barriers.

The testing of the *overlay technique* and the processing of cartographic output are, specifically, the aim of the second case study. The combination of geostatistical analysis (interpolation of the *Q-membership* by IDW or *kriging*) and genetic structure analysis, outputs a well-defined genetic structure and apparent genetic discontinuity between the 19 European populations of *C. sativa* examined. The distribution of different gene pools, identified through analysis of genetic structure and diversity, reflects the hypothetical location of glacial *refugia* of the species.

The third case study illustrates the application of the *overlay technique* to quantify the effects of landscape composition (post-glacial expansion, environmental and physical barriers), on gene flow and genetic variability of spatial resources of *J. regia* in the native range. This work provides a contribution to the project WA.L.NET, which represents the first large-scale evaluation of genetic resources of *J. regia* currently in the indigenous area. Although *J. regia* has been intensively manipulated by humans over the last 2000 years, the results indicate that multiple centers of genetic diversity still exist in the Caucasus and in the mountainous regions of Central Asia, where *J. regia* survived after the Pleistocene glaciations.

Genetic discontinuity and clear separation of the 39 walnut populations in four main clusters have been identified: the first one corresponding to the genotypes of Kyrgyzstan, from the mountains of western Tien Shan (Central Asia), the second predominant in western and south-central Asia, the third consists of individuals from east-central Uzbekistan (Nurata), the fourth consisting of individuals from the eastern and northern China (Xinjiang and Shandong provinces). The *overlay technique* suggests that current walnut genetic resources are the result of the combination of two factors: the geographical distance and the landscape resistance. It is possible to hypothesize that the presence of high mountain ranges (Himalaya, Tien Shan, Pamir, Hindu Kush, Zagros) and the progressive desertification of Central Asia during the Holocene have caused repeated events of fragmentation and genetic isolation of walnut populations after the LGM. Furthermore, as indicated by palynological studies, the complexity of the geographical area of native *J. regia* would have favored multiple glacial refugia, from which the genetic differentiation of the current populations of Persian walnut started.

Finally, the fourth case study is an innovative contribution to traceability study of the geographical origin of extra virgin olive oil, resulting from combining stable isotope analysis techniques (IRMS) and spatial analysis of the variability of such isotopic values.

In view of the globalization of markets, the agro-food quality is one of the most promising prospects for Italian farming. The product qualification and competitiveness must point to a high standard. The traceability analysis of the geographical origin of food is an important condition to protect the products and origin (PDO, PGI, organic products), to which the consumer is inclined to provide an added value, and to ensure their safety. Recent advances in isotope ratio mass spectrometry, coupled with elemental analysis and pyrolysis, allow the measurement of the isotopic ratios of light elements and the identification of the geographical origin of extra virgin olive oil. The combination of stable isotope techniques and spatial analyses of $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotopic values made possible to represent the spatial variability of the isotopic composition of 122

samples of Italian olive oil (Lombardia, Liguria, Toscana, Lazio, Molise, Puglia, Calabria, Sicilia and Sardegna).

This is the first known attempt of integration of isoscapes analysis in traceability studies of olive oils. The results indicate a splitting of the samples in four distinct areas: north, south-central Tyrrhenian, south-central Adriatic and islands. This division mainly depends on the geographical variability of climatic conditions in the Mediterranean basin. Homogeneous regions, based on spatial interpolation, provide a zonation of the expected isotopic signatures, which can be used to guarantee the origin of an extra virgin olive oil. The method appears promising in defining a protocol analysis of georeferenced data, with the aim of contrasting fraud and adulteration in the food industry.

RIASSUNTO

La continua e rapida crescita della pressione antropica sulle risorse naturali ha causato profonde modificazioni degli ambienti naturali. Degrado e perdita di habitat rappresentano fenomeni così diffusi che le implicazioni per la conservazione della diversità biologica e la sostenibilità delle risorse naturali sono di rilievo globale. La sopravvivenza e la diffusione di molte specie, se non addirittura d'interi biomi, sono messe seriamente a repentaglio dalla velocità di alcuni fenomeni quali il riscaldamento globale, la deforestazione incontrollata, i cambiamenti di uso del suolo e l'antropizzazione di vaste aree del nostro pianeta. L'assetto territoriale è sempre più riconducibile ad un mosaico di frammenti di dimensioni variabili, relitti di ambienti naturali, degradati dall'uso non sostenibile delle risorse naturali e dai cambiamenti di utilizzo del suolo. Molte specie, sia animali che vegetali, hanno subito estinzioni locali a causa della frammentazione e della perdita degli habitat, mentre la loro capacità di espansione e ricolonizzazione è ostacolata dallo scarso grado di connettività esistente tra i diversi frammenti in cui è scomposto il paesaggio. La conservazione della biodiversità dipenderà, dunque, in larga misura dal mantenimento di reti ecologiche funzionali e dalla capacità specifica di adattamento in habitat frammentati e antropizzati. Azioni mirate alla sostenibilità e la conservazione di risorse agrarie e forestali sono necessarie per arrestare la perdita di biodiversità e ripristinare le connessioni tra habitat. La necessità di comprendere le complesse interazioni tra le componenti biologiche, fisiche e socio-culturali che hanno prodotto l'attuale assetto paesaggistico, ha stimolato lo sviluppo di metodiche di studio interdisciplinari e transdisciplinari, che considerano il paesaggio, e tutte le variabili ad esso associate, quale elemento d'analisi fondamentale. La ricerca nell'ambito dell'ecologia del paesaggio ha migliorato la comprensione sia delle cause che delle conseguenze dell'eterogeneità spaziale, come queste variano con la scala, arrivando ad un'effettiva influenza sulla gestione di paesaggi più o meno naturali o dominati dall'uomo. La tecnologia GIS (*Geographical Information System*) e le sue funzioni di analisi spaziale sono divenute indispensabili per indagare la natura spaziale delle componenti biologiche, fisiche, socio-culturali ed antropiche e le loro relazioni. Sono considerate uno strumento di analisi fondamentale in studi di sostenibilità e di conservazione delle risorse naturali.

Questa tesi di dottorato indaga le potenzialità di applicazione delle analisi spaziali attraverso la discussione di quattro casi di studio, che affrontano i temi ampiamente dibattuti della sostenibilità e conservazione di risorse agro-forestali, partendo da diversi presupposti e in diversi contesti ambientali. Esplora, inoltre, la possibilità di coniugare ed integrare dati e metodi propri di diverse discipline scientifiche, quali l'ecologia e l'ecofisiologia, la genetica di popolazioni forestali e l'analisi del paesaggio attraverso l'utilizzo della tecnologia GIS e degli strumenti di analisi spaziale, favorendo così la connotazione interdisciplinare delle ricerche svolte. È il risultato di un lavoro di ricerca interdisciplinare in cui sono coinvolti gruppi di lavoro impegnati in studi di ecofisiologia vegetale, fisiologia degli isotopi stabili e genetica delle popolazioni forestali.

Il primo caso di studio affronta il tema della conservazione e dell'uso sostenibile delle risorse naturali amazzoniche nel territorio municipale di Moju (Parà, Brasile), dove negli ultimi decenni il progressivo sviluppo delle attività antropiche ha contribuito alla progressiva perdita di foresta primaria. In questa regione il processo di deforestazione, associato all'espansione dell'area urbana di Moju, alla diffusione di un'estesa rete stradale principale e secondaria, all'espansione delle aree destinate ad attività agricole e all'allevamento di bestiame, ha determinato un'elevata frammentazione dell'assetto paesaggistico. Sono state adottate ed integrate diverse metodologie di studio: interpretazione di immagini satellitari e analisi spaziali per la stima della deforestazione, l'analisi della copertura e uso del suolo di un sito sperimentale finalizzate alla stima della capacità del sequestro di carbonio; metodi dell'ecologia del paesaggio per l'identificazione di pattern spaziali della struttura paesaggistica; strategie per il recupero forestale. I risultati indicano un incremento della deforestazione del 6% tra il 2001 e il 2008, ma una lieve diminuzione della velocità di deforestazione; una perdita annua di copertura forestale pari a 90-100 km² di territorio, con una stima di superficie deforestata superiore al 40% del territorio municipale nel 2008. I principali pattern spaziali riscontrati nelle immagini del 2008, eterogenei per forma e dimensioni, associati a diverse tipologie di uso del suolo, testimoniano profonde modificazioni nell'uso del suolo nell'arco temporale 1984-2008. Le variazioni dei

valori dell'indice NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) osservati tra il 1984 e il 2008, testimoniano i fenomeni di degrado e di frammentazione che la copertura forestale ha subito, evidenziando l'espansione di aree antropizzate. In questa regione le dinamiche di antropizzazione sono fortemente cresciute nel corso degli ultimi decenni lasciando il territorio in uno stato di degrado e frammentazione e ponendo in seria crisi la funzionalità delle reti ecologiche. Sulla base di analisi della copertura e dell'uso del suolo condotte su un sito sperimentale di 7700 ha, impiegando dati di letteratura, è stato stimato uno stock di carbonio pari a oltre 0,65 milioni di tonnellate. Tale stock risulterebbe potenzialmente doppio in un territorio perfettamente integro. Per far fronte a queste emergenze è stato proposto un modello per la gestione sostenibile agro-forestale per il recupero della cosiddetta riserva legale, su scala aziendale. Una tale conversione stimolerebbe il ripristino delle funzionalità ecosistemiche essenziali al reinsediamento della foresta stessa e al recupero spontaneo della sua biodiversità, determinando la graduale ricomposizione degli elementi portanti della rete ecologica locale.

Il secondo e il terzo caso di studio indagano l'origine e i processi che hanno condizionato l'attuale distribuzione di *Castanea sativa* in Europa, e di *Juglans regia* in Asia, attraverso l'analisi spaziale della struttura e della diversità genetica delle attuali popolazioni, in relazione alle variabili paesaggistiche e ambientali. L'obiettivo generale è quello di applicare i principi della *landscape genetics*, che combina dati e metodi di analisi propri dell'ecologia del paesaggio, delle analisi statistiche spaziali e della genetica delle popolazioni per comprendere la struttura genetica spazialmente esplicita delle popolazioni in esame, gli effetti della struttura e natura della matrice paesaggistica sul flusso genico e sulla variabilità genetica. L'approccio analitico seguito corrisponde all'*overlay technique* che prevede di identificare i principali cluster di popolazioni (struttura genetica), le barriere e le discontinuità genetiche, di interpolare variabili genetiche per costruire isolinee genetiche. L'approccio, infine, è volto ad individuare le coincidenze geografiche tra discontinuità e barriere genetiche con gli elementi salienti del paesaggio. La sperimentazione dell'*overlay technique* e l'elaborazione di output cartografici rappresentativi della struttura e della diversità genetica costituiscono, nello specifico, l'obiettivo del secondo caso di studio. Attraverso la combinazione di analisi geostatistiche, interpolazioni del *Q-membership* tramite IDW o kriging (clustering surface map), e analisi della struttura genetica, è stato possibile valutare una ben definita struttura genetica ed evidenti discontinuità genetiche tra le 19 popolazioni europee di *C. sativa* esaminate. La distribuzione dei differenti pool genici, individuati attraverso l'analisi della struttura e della diversità genetica, riflettono l'ipotetica localizzazione dei rifugi glaciali della specie.

Il terzo caso di studio illustra l'applicazione dell'*overlay technique* per quantificare gli effetti della composizione paesaggistica (espansione post glaciale, barriere fisiche e ambientali), sul flusso genico e sulla variabilità genetica spaziale delle risorse di *J. regia* nell'area nativa. Il lavoro fornisce un contributo al progetto WA.L.NET, che rappresenta la prima valutazione su larga scala delle risorse genetiche di *J. regia* attualmente presenti nell'area di indigenato. Sebbene *J. regia* sia stata intensamente manipolata dall'uomo nel corso degli ultimi 2000 anni, i risultati indicano che esistono tuttora diversi centri di diversità genetica nel Caucaso e nelle regioni montuose dell'Asia centrale, dove *J. regia* è sopravvissuta dopo le glaciazioni pleistoceniche. Sono state individuate evidenti discontinuità genetiche e una chiara separazione delle 39 popolazioni di noce esaminate in quattro cluster principali: il primo corrispondente ai genotipi del Kirgizstan, provenienti dalle montagne del Tien Shan occidentale (Asia centrale); il secondo predominante in Asia occidentale e centro-meridionale; il terzo costituito da individui provenienti dall'Uzbekistan centro-orientale (Nurata); infine il quarto, costituito da individui provenienti dalla Cina orientale e settentrionale (province dello Xinjiang e Shandong). L'*overlay technique* suggerisce che le attuali risorse genetiche di noce siano il risultato della combinazione di due fattori: la distanza geografica e la resistenza della matrice paesaggistica. E' possibile ipotizzare che la presenza di imponenti catene montuose (Himalaya, Tien Shan, Pamir, Hindu Kush, Zagros) e la progressiva desertificazione dell'Asia centrale durante l'Olocene abbiano causato ripetuti eventi di frammentazione e di isolamento genetico delle popolazioni di noce dopo l'ultimo periodo di massima espansione glaciale. Inoltre, come indicato da studi palinologici, la complessità geografica della area nativa di *J. regia* avrebbe favorito un molteplice insediamento di rifugi glaciali isolati, dai quali si sarebbe avviata la differenziazione genetica delle attuali popolazioni di noce persiano.

Infine il quarto caso di studio rappresenta un contributo innovativo per lo studio della tracciabilità dell'origine geografica di oli extra vergine di oliva, frutto della combinazione delle tecniche di analisi degli isotopi stabili (IRMS) e di quelle di analisi spaziale della variabilità dei valori isotopici determinati. Nel panorama della globalizzazione dei mercati le produzioni agro-alimentari di qualità rappresentano una delle prospettive più promettenti per le aziende agricole italiane. La qualificazione del prodotto e la competitività devono puntare a standard qualitativi elevati. L'analisi di tracciabilità della provenienza geografica degli alimenti rappresenta una condizione importante per tutelare i prodotti ad origine controllata e protetta (DOP, IGP, prodotti biologici), ai quali il consumatore è disposto ad accordare un valore aggiunto, e per garantirne la sicurezza. I recenti progressi nella spettrometria di massa isotopica, accoppiata all'analisi elementare ed alla pirolisi, consentono la misura dei rapporti isotopici di vari elementi leggeri e l'identificazione dell'origine geografica di prodotti agroalimentari quali l'olio extravergine di oliva. La combinazione delle tecniche di analisi degli isotopi stabili e le analisi spaziali dei valori isotopici $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$, hanno consentito di rappresentare la variabilità spaziale della composizione isotopica di 122 campioni di oli di oliva italiani (Lombardia, Liguria, Toscana, Lazio, Molise, Puglia, Calabria, Sicilia e Sardegna). Si tratta del primo tentativo noto di integrare analisi *isoscares* in studi di tracciabilità degli oli di oliva. I risultati raggiunti indicano una suddivisione dei campioni esaminati in quattro aree geografiche distinte: nord, Tirreno centro-meridionale, Adriatico centro-meridionale e isole. Questa suddivisione dipende principalmente dalla variabilità geografica delle condizioni climatiche nell'areale mediterraneo. La visualizzazione di regioni omogenee, sulla base dell'interpolazione spaziale, fornisce di fatto una zonazione delle firme isotopiche attese a garanzia della provenienza di un olio extra-vergine. La metodologia appare promettente nel definire un protocollo di analisi di dati georeferenziati, con il fine della lotta a frodi ed adulterazioni nel settore agroalimentare.

1. Introduzione

La recente storia del nostro pianeta, provocatoriamente denominata *Antropocene* dal Premio Nobel Paul Crutzen, è caratterizzata da una continua e rapida crescita delle attività e della pressione antropiche sulle risorse naturali. Tutto questo causa profonde modificazioni degli ambienti naturali, tanto che degradazione e perdita di molti habitat sono così vaste e profonde che le implicazioni per la conservazione della diversità biologica e la sostenibilità delle risorse naturali sono di rilievo mondiale (Bennett 2003). Sebbene la degradazione degli ambienti naturali non sia un fenomeno nuovo, la rapidità e la globalità del processo destano grande preoccupazione (Brown 1981; Myers 1986; Houghton 1994). Nel più ampio scenario dei cambiamenti globali sono particolarmente urgenti strategie mirate alla conservazione e alla sostenibilità delle risorse ambientali. La sopravvivenza e la diffusione di molte specie, se non addirittura d'interi biomi, sono messe seriamente a repentaglio dalla velocità di alcuni fenomeni quali il riscaldamento globale, la deforestazione incontrollata, i cambiamenti di uso del suolo e l'antropizzazione di vaste aree del nostro pianeta. Le molteplici e continue interazioni che si verificano tra i processi abiotici e biotici alterano le già complesse dinamiche presenti nei diversi ecosistemi. Sebbene questi ultimi siano dotati di capacità autorganizzative, che favoriscono la loro persistenza, il rischio di un collasso biotico di vasta scala è sempre più stringente. Molti dei tratti naturali dei paesaggi ecologici sono stati modificati se non addirittura cancellati. L'assetto territoriale è sempre più riconducibile ad un mosaico di frammenti di dimensioni variabili, relitti di ambienti naturali, degradati dall'uso non sostenibile delle risorse naturali e dai cambiamenti di utilizzo del suolo. Molte specie, sia animali che vegetali, hanno subito estinzioni locali a causa della frammentazione e della perdita degli habitat, mentre la loro capacità di espansione e ricolonizzazione è ostacolata dallo scarso grado di connettività esistente tra i diversi frammenti in cui è scomposto il paesaggio. La conservazione della biodiversità dipenderà, dunque, in larga misura dal mantenimento di reti ecologiche funzionali e dalla capacità specifica di adattamento in habitat frammentati e antropizzati. Un'accurata conoscenza della diversità biologica delle specie viventi è indispensabile per lo sviluppo di strategie mirate alla gestione sostenibile delle risorse ambientali.

Il concetto di eterogeneità ambientale, intesa come complessità e variabilità dei sistemi biotici nello spazio e nel tempo (Li & Reynolds 1995), rappresenta una conoscenza antica. Tuttavia, un'esplicita attenzione alla comprensione dell'eterogeneità spaziale, rivelandone le complesse cause abiotiche e biotiche e conseguenze ecologiche (Turner 2005), emerse soltanto negli anni '80 con lo sviluppo di una nuova e dibattuta disciplina: l'ecologia del paesaggio, così come rielaborata a partire da esperienze europee da parte della scuola nord-americana (Farina 2001). Lo sviluppo tecnologico e la maggiore disponibilità di immagini aeree e dati satellitari su larga scala favorirono, in quegli stessi

anni, lo sviluppo dei sistemi informativi geografici (GIS) e dei metodi statistici spaziali (Fortin & Dale 2005). Da allora, i progressi dell'ecologia del paesaggio sono stati rapidi e sostanziali, con concetti e metodi ampiamente utilizzati e riconosciuti in molti studi ed applicazioni ecologici. La ricerca nell'ambito dell'ecologia del paesaggio ha migliorato la comprensione sia delle cause che delle conseguenze dell'eterogeneità spaziale, come queste variano con la scala, arrivando ad un'effettiva influenza sulla gestione di paesaggi più o meno naturali o dominati dall'uomo (Turner 2005). Il modello spazio-temporale delle forze esogene ambientali definisce la scena in cui si manifestano le interazioni tra individui, popolazioni, specie e comunità (Schroder & Seppelt 2006). La necessità di comprendere le complesse interazioni tra le componenti biologiche, fisiche e socio-culturali che hanno prodotto l'attuale assetto paesaggistico, ha stimolato lo sviluppo di metodiche di studio interdisciplinari e transdisciplinari, che considerano il paesaggio, e tutte le variabili ad esso associate, quale elemento d'analisi fondamentale. Il paesaggio è considerato quindi come la risultante di tutti i processi, antropici e naturali, che avvengono in un complesso mosaico di ecosistemi, sul quale insistono variabili spazialmente eterogenee. Le analisi spaziali consentono di indagare la natura spaziale delle componenti biologiche, fisiche, socio-culturali ed antropiche attraverso l'analisi della struttura e delle funzioni paesaggistiche e per questo sono considerate uno strumento fondamentale in studi di sostenibilità e di conservazione delle risorse naturali.

La recente combinazione dei principi dell'ecologia del paesaggio e della genetica di popolazione ha portato alla nascita della *landscape genetics* (Manel et al. 2003), una disciplina che mira a fornire informazioni sull'interazione tra le caratteristiche del paesaggio e i processi microevolutivi, come il flusso genico, la deriva genetica e la selezione naturale. Questo ha aperto nuove frontiere nello studio dei flussi genici e dell'adattamento delle specie ai cambiamenti ambientali.

Questa disciplina integra dati e metodi di analisi propri dell'ecologia del paesaggio, delle analisi statistiche spaziali e della genetica delle popolazioni, con l'obiettivo di comprendere proprietà complesse sul piano spaziale: la struttura genetica spazialmente esplicita delle popolazioni in esame; gli effetti della struttura e natura della matrice paesaggistica sul flusso genico e sulla variabilità genetica (Storfer et al. 2007). La sostanziale differenza tra il classico approccio di studio della genetica di popolazione e la *landscape genetics* è il riconoscimento della matrice paesaggistica quale fattore determinante nei processi biologici ed ecologici. La rapida adozione di questo nuovo approccio di ricerca ha portato allo sviluppo ed al perfezionamento di appropriati strumenti di analisi genetica, favorendone l'integrazione con strumenti di analisi statistica già esistenti o di nuova generazione. Inoltre i più diffusi pacchetti software GIS (*Geographic Information Systems*), sia sviluppati in ambiente open source che proprietari dispongono di funzioni di analisi geo-statistiche estremamente funzionali in studi di *landscape genetics*. La necessità di comprendere i flussi genici e l'adattamento all'ambiente di popolazioni forestali richiede una profonda conoscenza

delle caratteristiche del paesaggio che hanno influenzato l'attuale distribuzione delle risorse genetiche. Questa comprensione può contribuire sia ad un approfondimento delle conoscenze ecologiche che ad un'adeguata gestione delle risorse genetiche di popolazioni a rischio di estinzione (Manel et al. 2003). I punti chiave della *landscape genetics*, secondo Manel et al. (2003), sono l'individuazione delle discontinuità genetiche tra popolazioni e la loro correlazione con gli elementi paesaggistici e ambientali riconducibili a barriere (grado di insularità, discontinuità orografiche, gradienti climatici, caratteristiche geo-pedologiche). Holderegger et al. (2006) mettono in evidenza la necessità di lavorare su due data set distinti, ossia i dati genetici da un lato e i dati ecologico-paesaggistici dall'altro, individuando barriere, transizioni o gradienti in entrambe i data set. Rispetto ai classici studi di metapopolazione, spazialmente impliciti, la *landscape genetics* è molto più vicina al mondo reale, considerando che il paesaggio con la sua composizione, la sua configurazione spaziale e le sue dinamiche, influisce sull'attuale grado di connettività tra popolazioni. Studi recenti hanno dimostrato che modelli di analisi multivariata, che includono le variabili paesaggistiche, funzionano significativamente meglio dei semplici test di *isolation by distance* per spiegare la varianza nella distanza genetica tra popolazioni (Storfer et al. 2010). La *landscape genetics* è quindi un'importante tematica di ricerca emergente, che integra la struttura paesaggistica con la genetica di popolazione e, nonostante le attuali lacune teoriche e paradigmatiche, ha un'intrinseca potenzialità di divenire disciplina scientifica. Inoltre, questo nuovo approccio dispone di potenzialità investigative utili non solo ai genetisti di popolazione, ma anche agli ecologi del paesaggio che possono comprendere rilevanti dinamiche e processi paesaggistici dall'integrazione dei metodi genetici. Holderegger et al. (2010) hanno constatato che gli studi condotti su piante seguendo i principi della *landscape genetics* sono ancora pochi se raffrontati a quelli sulle specie animali, evidenziando le maggiori difficoltà nel definire un idoneo approccio di studio.

Infine nello scenario dei cambiamenti globali è importante prevedere le conseguenze che l'attività umana determina sui processi che regolano la biosfera. La possibilità di creare modelli di previsione, spazialmente espliciti, dipende essenzialmente dalla esatta comprensione del processo in questione e dall'accuratezza dei dati disponibili. Grazie ai recenti progressi nella spettrometria di massa isotopica e alla maggiore disponibilità di dati isotopici, insieme al continuo sviluppo delle tecnologie GIS e della creazione di ampi dataset spaziali, nascono gli *isoscapes* (West et al. 2010), letteralmente da *isotopes* e *landscapes*, come modelli spazialmente espliciti per comprendere e quantificare la distribuzione spazio-temporale della variabilità dei rapporti isotopici nei sistemi naturali. Oltre a fornire un'utile rappresentazione cartografica delle variazioni isotopiche, un *isoscape* rappresenta un fondamentale strumento di indagine dei processi e delle cause alla base delle stesse variazioni.

Questa tesi di dottorato, risultato delle attività di ricerca svolte presso l'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR, esplora la possibilità di coniugare ed integrare dati e metodi propri di diverse discipline scientifiche, quali l'ecologia e l'ecofisiologia, la genetica di popolazioni forestali e l'analisi del paesaggio attraverso l'utilizzo della tecnologia GIS e degli strumenti di analisi spaziale, favorendo così la connotazione interdisciplinare delle ricerche svolte. È il risultato di un lavoro di ricerca interdisciplinare in cui sono coinvolti gruppi di lavoro impegnati in studi di ecofisiologia vegetale e degli isotopi stabili nonché di genetica delle popolazioni forestali.

I quattro casi di studio in cui è articolata la tesi esplorano le potenzialità delle tecniche di analisi spaziale in diversi contesti di studio, tutti rivolti alla sostenibilità d'uso e alla conservazione di risorse agrarie e forestali.

2. Primo caso di studio - Analisi spaziali nel “Progetto per la implementazione di filiere integrate alimentari e bioenergetiche sostenibili nello stato amazzonico del Parà”

Questo primo caso di studio affronta il tema della conservazione e dell'uso sostenibile delle risorse naturali amazzoniche. È parte integrante del Progetto per la implementazione di filiere integrate alimentari e bioenergetiche sostenibili nello stato amazzonico del Parà (Brasile). Lo scopo del progetto è indagare la fattibilità di piani di sviluppo sostenibile, finalizzati ad un uso non depauperativo ma conservativo o, se possibile, migliorativo delle risorse naturali dell'Amazzonia, prestando massima attenzione alla comprensione ed al rispetto delle culture locali ed all'opportunità di migliorare le condizioni di vita nel pieno rispetto dei valori ambientali della regione.

Il sito di intervento è ubicato nella fascia amazzonica orientale nel municipio di Moju, stato del Parà (Brasile), dove negli ultimi decenni il progressivo sviluppo delle attività antropiche ha contribuito alla perdita di foresta amazzonica. Il progetto ha come obiettivi di pianificazione:

- la riforestazione e il recupero dell'area impiantando specie forestali e un mix di specie oleaginose, sia introdotte, sia native della fascia amazzonica, puntando al ripristino delle sue condizioni di biodiversità e all'immagazzinamento del carbonio atmosferico;
- l'allestimento di un impianto di produzione di olio vegetale utilizzabile a fini energetici, sia sul mercato interno che internazionale;
- la realizzazione di opere ed infrastrutture per migliorare le condizioni di vita delle comunità locali e per la sostenibilità sociale dell'intervento.

Le attività descritte in questo caso di studio hanno contribuito al raggiungimento degli obiettivi di pianificazione sopra elencati. Particolare attenzione è stata posta all'analisi della struttura paesaggistica seguendo i principi dell'ecologia del paesaggio, con riguardo alla conservazione della biodiversità e all'immagazzinamento del carbonio atmosferico. Le analisi spaziali sono state applicate per raggiungere i seguenti obiettivi: la stima della deforestazione nel municipio di Moju, attraverso l'elaborazione di immagini satellitari, utilizzando anche dati spaziali disponibili per la regione amazzonica; la stima della capacità di stoccaggio del carbonio dell'area sperimentale, rappresentativa di aree amazzoniche degradate; la progettazione di un modello per ripristinare la capacità di accumulo del carbonio nelle foreste dell'area sperimentale.

2.1 Introduzione

Il dominio ecologico amazzonico, rappresenta il più vasto insieme di foreste tropicali del Mondo. Tale dominio si è evoluto nel corso di molti milioni di anni. È soltanto da circa 500 anni che la

pressione antropica si sta organizzando con intensità esponenzialmente crescente sullo stesso dominio.

Le problematiche dell'Amazzonia ovviamente non rimangono confinate alla realtà locale ma possiedono una nota risonanza globale, data la rilevanza del bioma amazzonico nei riguardi della biodiversità e della regolazione dei cicli biogeochimici a livello planetario. Tra i principali elementi critici della regione si possono riconoscere il pascolo estensivo, lo sfruttamento incontrollato delle foreste e l'attuale modello fondiario. La foresta amazzonica ha subito profonde modificazioni ad opera dell'uomo negli ultimi decenni (Walker & Homma, 1996), con tassi di deforestazione massimi raggiunti negli anni '80 e '90 dello scorso secolo, mentre un certo rallentamento è stato registrato negli ultimi anni. In Brasile il tasso di deforestazione è quasi raddoppiato tra il 2001 e 2003, raggiungendo i 2.6×10^6 ha all'anno (Fearnside & Barbosa, 2004).

Storicamente il processo di deforestazione cominciò con attività per la raccolta del legname su piccola scala, spesso con l'intento di favorire un'agricoltura di sussistenza. A questi disturbi su scala locale sono seguiti processi di deforestazione su più ampia scala, con l'introduzione di pascoli per l'allevamento brado di bestiame e la costituzione di fazende con superfici di migliaia di ettari. La perdita di fertilità ed il degrado dei suoli, in conseguenza del pascolo estensivo, ha condotto a frequenti fenomeni di abbandono del territorio. Tuttavia, l'abbandono non è sempre sinonimo di processi successionali verso formazioni di foresta secondaria. La lisciviazione dei suoli e la formazione di orizzonti cementati (plinthosol) determina, piuttosto, la genesi di savane inondate, i cosiddetti *campos* caratterizzati da ridottissimi livelli di biodiversità e produttività. L'introduzione più recente di un'agricoltura meccanizzata su aree sempre più vaste e la conseguente espansione delle coltivazioni ha contribuito alle attuali dinamiche di deforestazione.

È possibile distinguere due principali categorie di effetti derivati dalle attività umane sulle foreste tropicali (Wright 2005): effetti locali, che includono il cambiamento d'uso del suolo, il prelievo di legname e l'introduzione di specie invasive; effetti globali come i cambiamenti climatici, legati al consumo di combustibili fossili ed all'emissione di gas ad effetto serra. In generale il fenomeno è accompagnato da un aumento della popolazione e dallo sviluppo economico, con conseguente incremento della velocità e dell'intensità della pressione antropica sulle foreste. Non potendo prescindere da questi fattori è importante arrivare a definire strategie mirate ad uno sviluppo economico sostenibile, che guardi attentamente alla preservazione ed al recupero del ruolo delle foreste nel ciclo del carbonio e nella conservazione della biodiversità.

Recentemente, fattori economici e l'intervento del governo federale, mirato alla preservazione della foresta tropicale, hanno portato a cambiamenti significativi, con il dimezzamento del tasso di deforestazione tra il 2004 e il 2007. L'adozione di normative da parte del governo federale brasiliano, destinate a preservare la foresta tropicale, ha reso necessario che il processo di

deforestazione nell'Amazzonia brasiliana fosse monitorato con debita attenzione. A tale scopo l'INPE (Istituto Nacional de Pesquisas Espaciais) ha attuato un programma di monitoraggio da satellite della foresta amazzonica. Tale programma, articolato in quattro sistemi operativi complementari tra loro, consente di delineare le fasi, le modalità ed il grado di deforestazione dell'Amazzonia e di allertare le zone a rischio. L'INPE (2000, 2003) ha stimato un tasso annuo di deforestazione che varia tra 11000 e 29000 km²/anno, attraverso il sistema Prodes (Programa de Cálculo do Desflorestamento da Amazônia), che controlla la deforestazione nell'Amazzonia brasiliana dal 1988, producendo ogni anno una carta delle deforestazione della regione amazzonica. Le immagini Landsat, che forniscono informazioni per un periodo di tempo di trenta anni, sono state utilizzate per studiare la deforestazione in Brasile a livello regionale (Houghton et al. 2001; INPE 2000, 2003). La degradazione forestale, intesa come combinazione degli effetti prodotti dagli incendi, lo sfruttamento selettivo delle risorse forestali e della frammentazione, è stata, recentemente, riconosciuta come una delle principali fonti dei cambiamenti della copertura del suolo. Per Roberts et al. 2003 il potenziale impatto della degradazione forestale sulle emissioni di carbonio è una delle maggiori problematiche di ricerca e non è stata ancora quantificata l'estensione di questo fenomeno. Le informazioni di natura spaziale sul degrado delle foreste e l'uso delle analisi spaziali (Souza et al. 2003) possono contribuire alla predisposizione di piani di sviluppo economico, di conservazione, nonché a formulare o migliorare modelli ecologici di valenza locale e globale e stimare il bilancio del carbonio.

Qualsiasi azione per il recupero e la conservazione del bioma amazzonico e della biodiversità prevede di produrre effetti positivi in termini di immagazzinamento del carbonio nelle foreste. Sia la conversione delle foreste primarie in altre tipologie di vegetazione che la riduzione della biomassa hanno contribuito in modo significativo alla diminuzione delle carbon stock in Amazzonia nel corso degli ultimi decenni.

2.1 Sito d'intervento

Il sito di intervento, oggetto di questo studio, è ubicato nel municipio di Moju, nella fascia amazzonica orientale, microregione Tomé-Açu, stato del Pará (fig.1).

Dal punto di vista ecologico quest'area è rappresentativa di un ecoregione classificata come foresta pluviale tropicale nel bioma Amazzonico (WWF – IBAMA). Questa regione è caratterizzata da una biota assai ricca e variegata, con endemismi unici grazie alla localizzazione all'estremità orientale del bacino amazzonico ed al carattere di transizione tra la zona pluviale del bacino stesso a nord e quella più arida del plateau centrale brasiliano a sud. La temperatura media annua è di 26°C mentre la pluviometria varia dai 2500 mm annui di Belém ai 1500 mm nel plateau meridionale. Nonostante

il ragguardevole ammontare annuo, pronunciata è la stagionalità delle precipitazioni, con circa 5 mesi con medie mensili inferiori ai 100 mm. I suoli sono generalmente poveri con preponderanza di argille fortemente liscivate. Sono presenti due tipi di foreste: le foreste di *terra firme* e quelle di *várzea* (foreste inondate). Queste ultime appartengono a due categorie a seconda che siano inondate da fiumi ad acqua scura (*igapós*) o bianca (*várzeas* vere e proprie). Le acque scure prendono il colore dalla dissoluzione dei tannini dalle lettiere inondate. Queste acque sono tuttavia povere di nutrienti e di particelle in sospensione. Gli *igapós* inondati non ne traggono, così, un beneficio in termini di fertilità. I loro suoli sono costituiti da sabbie bianche, povere ed acide. La vegetazione è di conseguenza specializzata a tali condizioni stagionali, con una forte capacità di ricircolo dei nutrienti. Le acque bianche sono altamente ricche di nutrienti e di materiale sospeso tanto che la *várzea* è ambiente con una complessa e ricca catena trofica.

Negli ultimi decenni lo sfruttamento non sostenibile delle risorse come l'estrazione non pianificata del legname, la deforestazione per l'agricoltura e l'allevamento hanno provocato la degradazione dei suoli, e un'elevata frammentazione della foresta primaria. Questa evoluzione riflette quella degli altri stati brasiliani situati lungo il cosiddetto arco di deforestazione, corrispondente al margine meridionale e orientale dell'Amazzonia brasiliana (FAO 2006, Fearnside 2009, Giglio et al. 2006).

Il municipio di Moju ha un'estensione di 9094 km², la sua popolazione ammonta a 70018 abitanti, con una densità abitativa di 7.70 ab/km² (dati IBGE 2010). Un terzo della popolazione vive in aree urbanizzate, mentre la maggior parte vive in aree rurali.

Il territorio di Moju ha una grande vocazione agricola basata per lo più su un'agricoltura di sussistenza, dove la manjoca rappresenta il principale prodotto. Il sistema agricolo si basa su superfici aziendali di circa 25 ha che sono coltivati secondo il principio della shifting cultivation o natural fallow. Nel territorio di Moju sono anche presenti poche grandi aziende di circa 800-1000 ha destinate all'allevamento secondo il metodo allo stato brado. Il carico di bestiame è generalmente limitato intorno a valori di 1 capo/ha. Inoltre è stata introdotta la coltivazione della palma da olio che prevede una forma di gestione estremamente intensiva.

L'impatto antropico su di un bioma altamente ricco ed allo stesso modo fragile può avere esiti ecologicamente drammatici. L'esbosco, l'incendio, la trasformazione in pascoli estensivi e l'agricoltura industriale, sono fattori capaci di interrompere il complesso processo di conservazione ed evoluzione della foresta pluviale. Le diverse tipologie di uso agrario e zootecnico fanno emergere problemi salienti di insostenibilità d'uso del suolo, richiedendo strategie e pianificazioni di conversione d'uso verso tipologie agrarie o meglio agroforestali rispettose dei principi di sostenibilità e di recupero ambientale.

La comprensione delle condizioni sociali e ambientali di questa regione, sono fondamentali per la progettazione di modelli innovativi di sviluppo sostenibile, con l'obiettivo di migliorare le

condizioni di vita delle popolazioni locali, nel pieno rispetto dei valori ambientali e per preservare e ripristinare le funzioni delle foreste nel ciclo del carbonio e la conservazione della biodiversità.

2.3 Materiali e metodi

I dati di natura spaziale utilizzati in questo studio, acquisiti da spatial web-database, sono descritti in tabella 1. Sia i dati in formato raster che vettoriali, forniti nel sistema di riferimento SAD 1969 UTM zona 23S, sono stati integrati in un sistema informativo geografico, in ambiente ESRI ArcGIS 9.3.

Tabella 1 – Dati spaziali

Dati spaziali		Fonte	Download
Immagini Landsat TM 5 (1984 - 2008) (geotiff)	Scene: 223061 223062 224061 224062	INPE Istituto Nazionale per la Ricerca Spaziale (Brasile)	Catalogo immagini satellitari http://www.dgi.inpe.br/CDSR/
Dati geografici di base (shapefile)	Limiti amministrativi, idrografia, rete viaria, ecc.	IBGE Istituto Brasiliano di Geografia e Statistica	ftp://geoftp.ibge.gov.br/ http://mapas.ibge.gov.br/
Dati Vegetazione (shapefile)	Carta della vegetazione, regioni fitoecologiche	MMA Ministero dell'Ambiente Brasiliano	http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm
Dati Deforestazione, Degradazione forestale (shapefile, geotiff)	Prodes digital, Deter	INPE (Sistemi Prodes e Deter)	http://www.dpi.inpe.br/prodesdigital/prodes.php http://www.dpi.inpe.br/prodesdigital/dadosn/

Le immagini Landsat TM 5 sono state mosaicate per coprire l'area della municipalità di Moju. Il processamento delle immagini è stato condotto con il software SPRING (Camara et al. 1996). Le immagini, relative al 2008 (anno di acquisizione più recente), sono state segmentate secondo la tecnica region-growing, che prevede il raggruppamento di regioni spazialmente adiacenti. Le immagini segmentate sono state in seguito classificate seguendo la tecnica *supervised*, utilizzando *training area* opportunamente individuate per produrre una carta della deforestazione. Questa elaborazione ha consentito di stimare il grado di deforestazione nel municipio di Moju per l'anno 2008. Inoltre sono stati acquisiti i dati di deforestazione elaborati dal progetto PRODES per gli anni 2001 e 2008 per l'area in esame e sono stati confrontati con la carta della deforestazione prodotta. Le immagini segmentate sono state utilizzate, inoltre, per l'identificazione dei pattern spaziali, rappresentativi della struttura paesaggistica dell'area di studio (Silva et al. 2008).

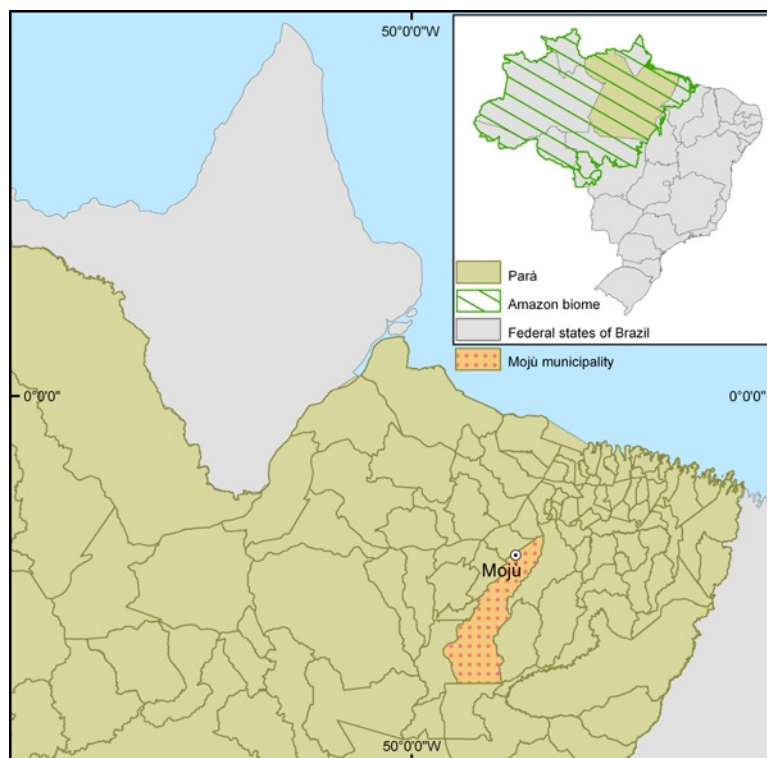


Fig. 1 - Localizzazione geografica del municipio di Moju.

L'indice di vegetazione NDVI, *Normalized Difference Vegetation Index*, (Lillesand & Kiefer 2000), è stato calcolato per il periodo di tempo 1984 – 2008 (mese di Luglio), per valutare le variazioni nello stato della vegetazione in questo arco temporale. La funzione *Raster Calculator*, del modulo Spatial Analyst di ArcGis 9.3, è stata utilizzata, per calcolare l'indice NDVI.

Questo indice di vegetazione mette in relazione l'assorbimento spettrale della clorofilla nel rosso, con la tipica riflessione nel vicino infrarosso, fortemente influenzata dal tipo di struttura fogliare:

$$NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$$

dove R_{NIR} è la riflettanza nel vicino infrarosso e R_{RED} è la riflettanza nel rosso. L'indice NDVI fornisce un valore numerico adimensionale, teoricamente compreso tra -1 e +1. Tale valore è strettamente correlato allo stato della vegetazione, intesa come biomassa e area fogliare, ed ai processi biochimici ad essa correlati (attività fotosintetica). La vegetazione appare molto scura nello spettro visibile (0,45-0,69 μm) a causa dell'elevato assorbimento della luce da parte dei pigmenti fogliari e quindi presenta una scarsa riflettività; quest'ultima aumenta sensibilmente attorno a 0,55 μm (verde), a causa di un minor assorbimento della clorofilla in questa banda. Nell'infrarosso vicino (0,76-0,90 μm) la vegetazione appare molto chiara, per le sue caratteristiche chimiche, e quindi presenta alta riflettività e debole assorbimento. Infine nell'infrarosso medio (1,3-2,5 μm) la vegetazione appare relativamente scura, a causa dell'assorbimento della radiazione da parte dell'acqua e dei costituenti prevalentemente cellulósici e ligninici. Il caratteristico comportamento di foglie non sottoposte a stress è, infatti, il riflettere solo circa il 10% della radiazione incidente

nella regione spettrale del visibile (rosso) e, allo stesso tempo, il riflettere oltre il 40 % di quella incidente nell'infrarosso vicino. Quindi bassi valori dell'NDVI si hanno in aree a bassa o assente copertura vegetale o dove la vegetazione presente è senescente o sofferente, mentre alti valori rispecchiano una situazione di forte attività fotosintetica e quindi di elevata presenza di biomassa.

Nel municipio di Moju è stato individuato un sito sperimentale, rappresentativo del territorio municipale per tipologia di uso e copertura del suolo. Su questo sito è stata condotta un'analisi della copertura e dell'uso del suolo, applicando una tecnica di classificazione *supervised* delle immagini Landsat precedentemente elaborate. Seguendo le indicazioni del programma Prodes (INPE 2008) sono state identificate zone a diverso grado di deforestazione, sono state prodotte carte della copertura e dell'uso del suolo per l'anno 2008. Sono state confrontate le immagini relative al 1984, 2001 e 2008 per identificare le dinamiche di deforestazione e i cambiamenti nell'uso del suolo.

Inoltre le analisi della copertura e dell'uso del suolo hanno consentito di stimare la capacità di stoccaggio del carbonio nel territorio in esame per poter progettare, infine, un modello per il ripristino della capacità di accumulo del carbonio nelle foreste del sito sperimentale. I differenti scenari sono stati delineati sulla base dei modelli di uso e copertura del suolo, integrando, inoltre, dati tratti dalla letteratura scientifica (Uhl et al. 1988).

2.3 Risultati

La fotointerpretazione delle immagini Landsat 5 ha consentito di individuare le seguenti classi: aree con foresta, aree deforestate, aree non forestate, idrografia e aree coperte da nuvole. La carta della deforestazione elaborata per il territorio municipale di Moju è rappresentata in figura 2. I dati stimati indicano che nel 2008 circa il 41% del territorio municipale risulta deforestato, mentre il 54% preserva una copertura forestale, con un'incertezza del 3%, dovuta alla presenza di copertura nuvolosa. I dati tratti dal sistema Prodes e relativi alla stima della deforestazione per gli anni 2001 e 2008 sono riportati in tabella 2. I risultati ottenuti non coincidono perfettamente con i dati Prodes, e mostrano una sottostima per l'area deforestata di circa il 2%. Considerando che la tecnica di classificazione *supervised* è strettamente dipendente dalle capacità interpretative dell'operatore, i risultati ottenuti sono considerati compatibili con i dati Prodes.

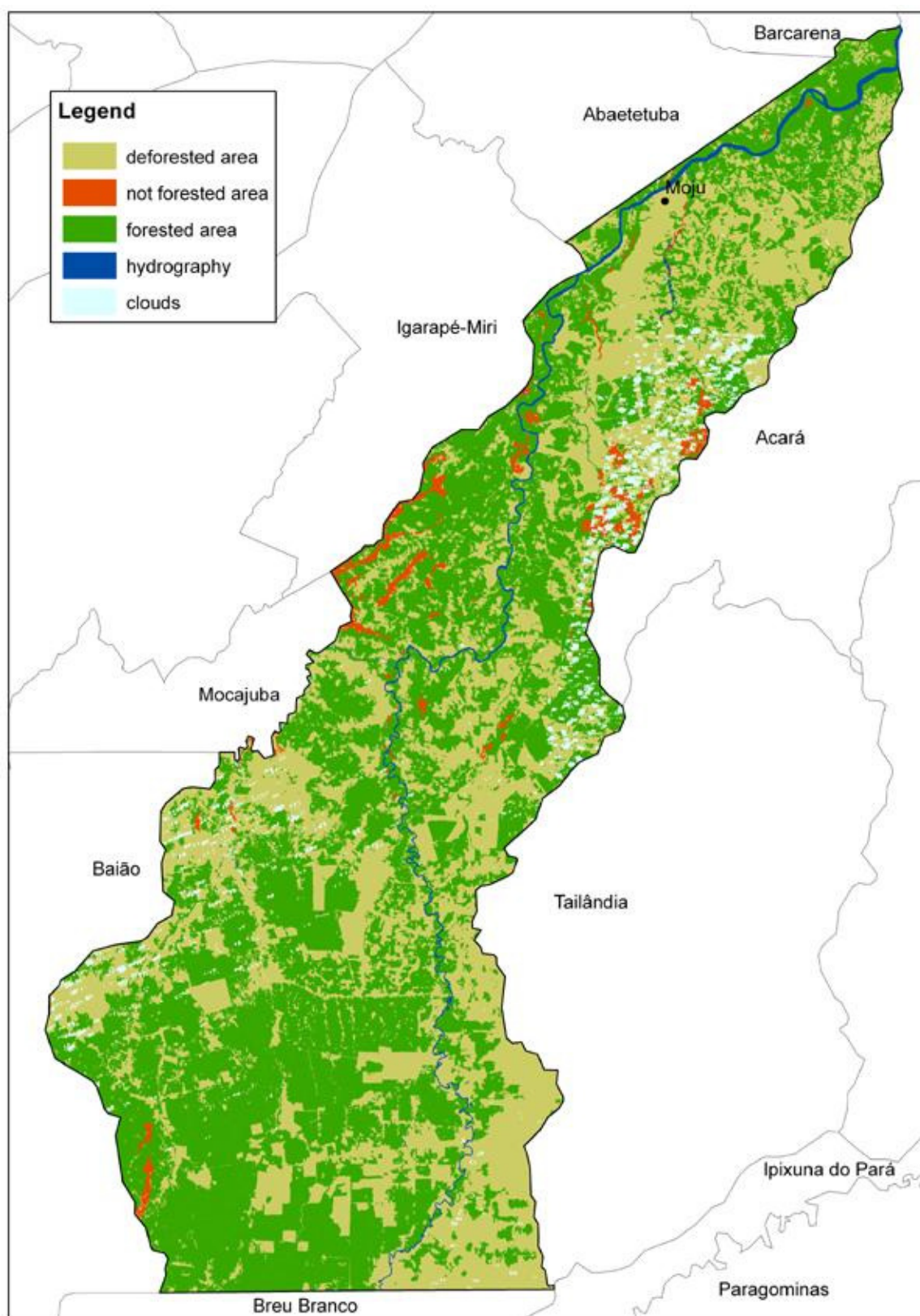


Fig. 2 – Carta della deforestazione del municipio di Moju.

Tabella 2. Dati desunti dalla carta della deforestazione elaborata da Prodes per gli anni 2001 e 2008.

Deforestazione (dati Prodes)	2001	2008
Area deforestata	38.36%	43.30%
Area Forestata	56.01%	53.50%
Area non Forestata	1.83%	2.08%
Hidrografia	0.91%	0.78%
Copertura nuvolosa	2.89%	0.34%
Dati tratti dal Sistema Prodes (Monitoramento da floresta amazonica brasilera por satellite). Fonte INPE		

I dati Prodes (tabella 3) indicano un incremento della deforestazione del 6% dal 2000 al 2001 e un incremento annuo costante pari a 1% dal 2001 al 2008. Ciò significa che nel municipio di Moju la velocità di deforestazione è lievemente diminuita tra il 2001 e il 2008, sebbene per ogni anno sia stata stimata una perdita di superficie forestale pari a 90-100 km² del territorio municipale. Ne conseguono: costante perdita annuale di foresta primaria, degradazione degli habitat, cambiamenti nell'uso del suolo, aumento delle emissioni di carbonio nell'atmosfera, frammentazione della matrice paesaggistica territoriale.

Tabella 3. Dati sulla deforestazione data tratti da Prodes per il municipio di Moju, dal 2000 al 2008.

	Deforestazione (km ²)	Deforestazione (%)	Incremento annuo di deforestazione (%)	Foresta (%)
2000	2673.00	29.3	-	56
2001	3243.40	35.5	6	50
2002	3318.00	36.3	1	49
2003	3434.00	37.6	1	48
2004	3563.10	39.0	1	46
2005	3644.20	39.9	1	43
2006	3753.50	41.1	1	30
2007	3832.00	42.0	1	28
2008	3947.50	43.2	1	54

Dati tratti dal Sistema Prodes (Monitoramento da floresta amazonica brasilera por satellite). Fonte INPE

Sono stati, inoltre, identificati i principali pattern spaziali nel territorio di Moju (fig. 3). In accordo con Silva et al. (2008), queste diverse forme spaziali sono associabili a diverse tipologie di uso del suolo e possono essere distinte in:

- a) elementi di forma lineare, distribuiti ai margini di strade, con superficie variabile. Sono associate all'utilizzo da parte di piccoli proprietari terrieri per un uso agricolo di sussistenza;
- b) elementi molto piccoli ed irregolari, localizzati nei pressi dei principali insediamenti e alle strade principali, con superficie molto piccolo (<35 ha). Sono associati a piccoli proprietari terrieri per un uso agricolo familiare e allevamento di bestiame;
- c) elementi piccoli, irregolari e sub-regolari, localizzati nelle vicinanze delle strade principali e degli insediamenti abitati, con dimensioni piccole (35 – 190 ha). Associati a piccole aziende per l'allevamento del bestiame.
- d) elementi medi, da irregolari a sub-regolari, isolati o prossimi a strade secondarie, con superficie di media estensione (190 - 900 ha). Sono riconducibili a aziende di medie dimensioni per l'allevamento di bestiame.
- e) grandi elementi di forma geometrica, isolati o localizzati al termine di strade secondarie, con vaste superficie (> 900 ha). I grandi proprietari terrieri li utilizzano per l'allevamento del bestiame. Alcune di questi grandi appezzamenti sono utilizzati per la coltivazione intensiva della palma da olio.

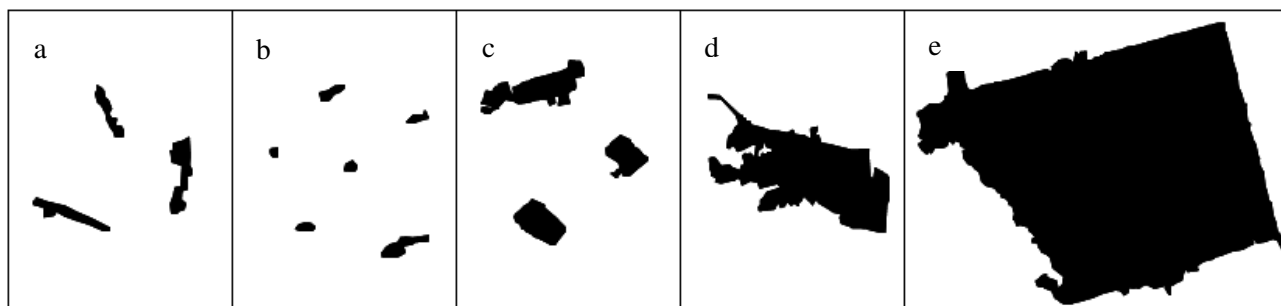


Fig. 3 – Principali pattern spaziali riconosciuti nel territorio di Moju, in accordo con Silva et al. (2008).

La distribuzione spaziale dell'indice di vegetazione NDVI, calcolato per l'arco temporale 1984 – 2008 (fig. 4) mostra una lieve diminuzione dei valori medi ed un incremento delle superfici con bassi valori di NDVI. Ciò può testimoniare che in queste aree si è verificato un degrado della copertura forestale, nell'arco di tempo considerato, se non una totale perdita della foresta primaria. In figura 4 si può osservare, inoltre, la progressiva espansione del centro abitato di Moju, dal 1984 al 2008. I valori medi di NDVI si mantengono comunque elevati per tutti gli anni esaminati, a testimonianza di un'intensa attività fotosintetica della vegetazione. L'incremento dell'eterogenità

spaziale dei valori di NDVI, dal 1984 al 2008, evidenzia invece lo stato di degrado e di frammentazione della copertura forestale.

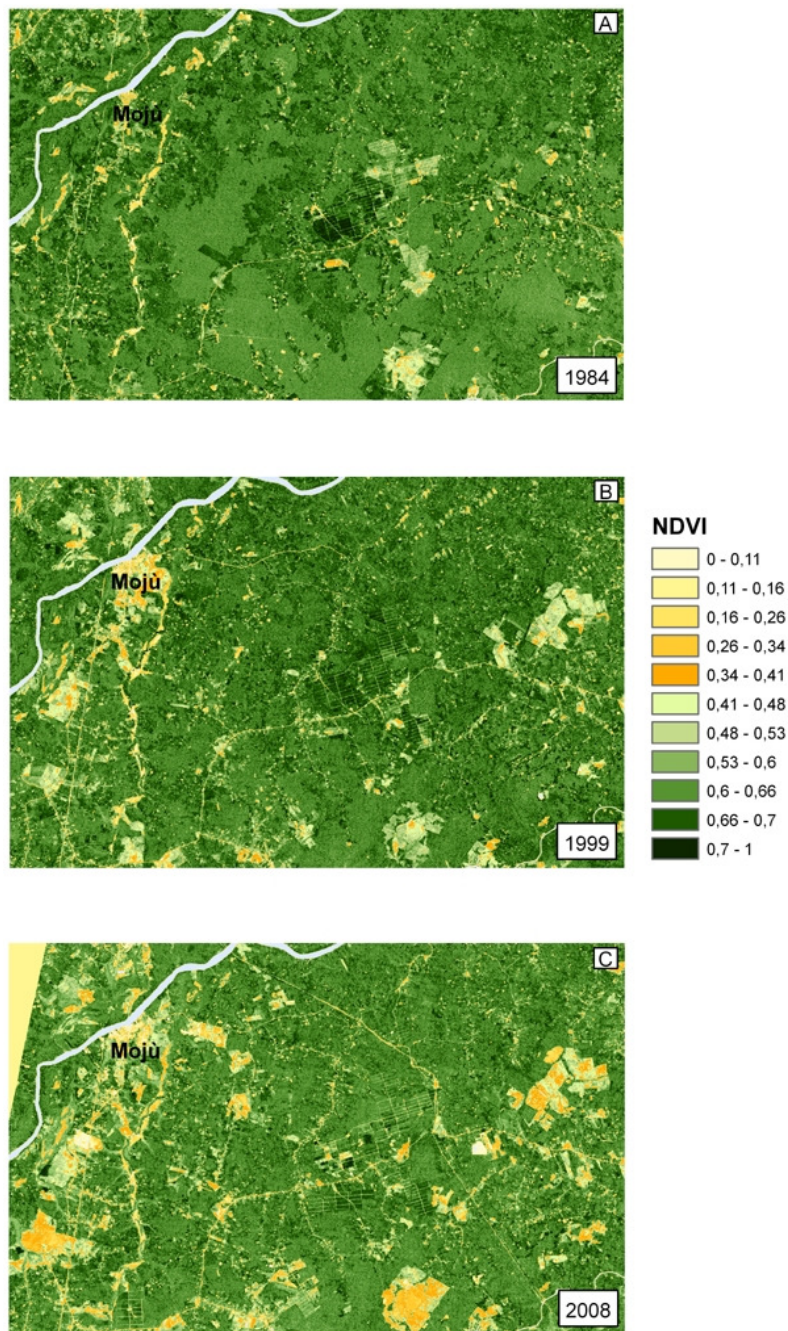


Fig. 4 - NDVI calcolato per gli anni 1984 (A), 1999 (B) e 2008 (C).

Il sito sperimentale, localizzato nei pressi del centro abitato di Moju, è rappresentativo del territorio municipale sia per il tipo di copertura del suolo che per il suo utilizzo. Sono state identificate zone a diverso grado di deforestazione, seguendo le indicazioni del programma Prodes (INPE 2008).

Dal confronto delle immagini del 1984 e 2008, per l'area del sito sperimentale, risulta che il 24% dell'area totale è stata completamente deforestata, il 30% è ampiamente deforestata con estese aree di suolo nudo, il 28 % ha una copertura forestale discontinua con piccole aree di suolo nudo, mentre

il restante 18% mostra una copertura forestale ancora integra (fig. 5 A). Per ogni poligono sono state identificate classi di uso e di copertura del suolo e sono state prodotte la carta di copertura e uso del suolo (fig. 5 A e B).

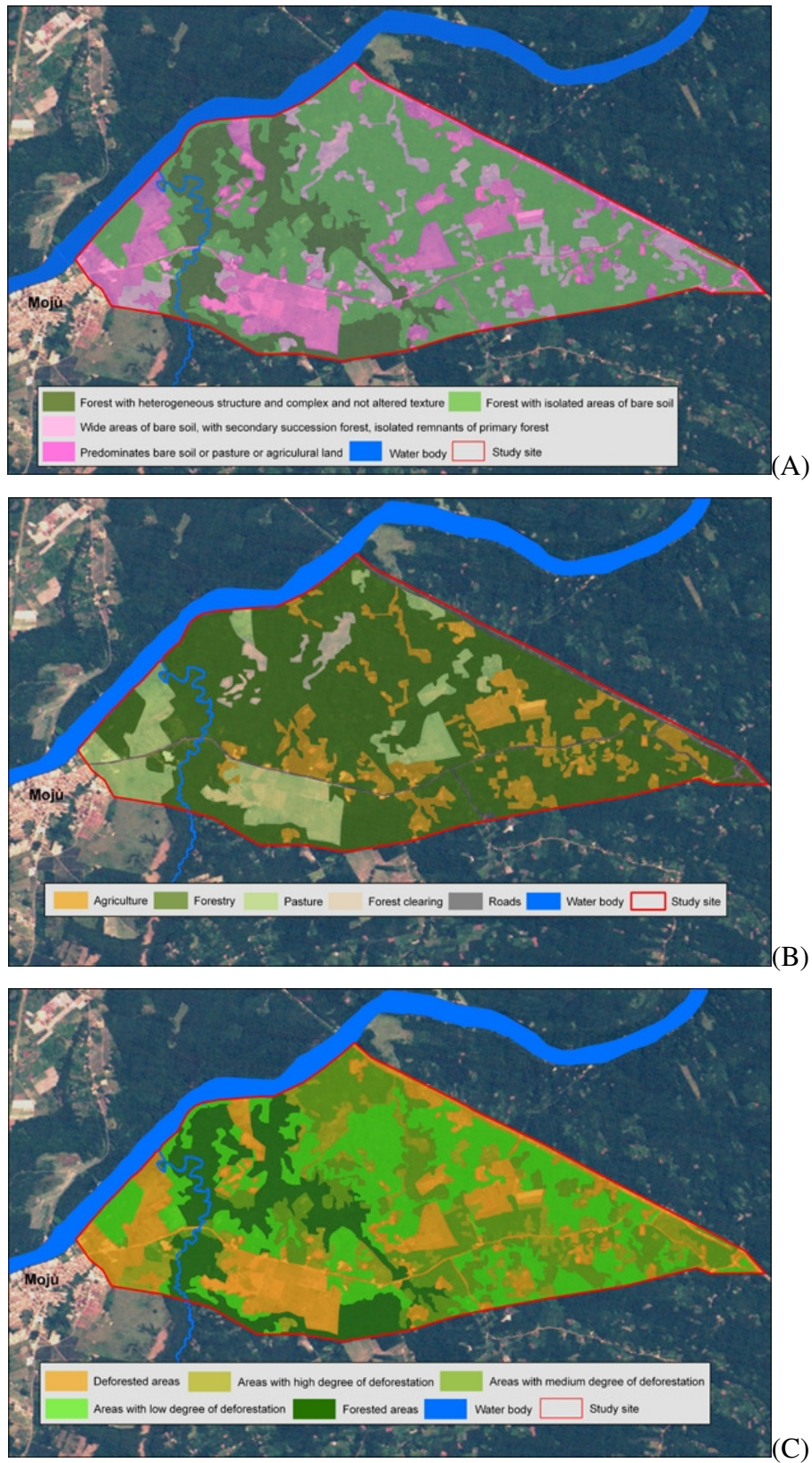


Fig. 5 - Land cover map (A), Land use map (B), grado di deforestazione per il sito sperimentale (C).

Sulla base delle analisi della copertura, dell'uso del suolo e del grado di deforestazione (rispettivamente (A), (B) e (C) in figura 5) condotte sul sito sperimentale, e considerando i dati disponibili in letteratura è stato stimato uno stock di carbonio per l'area sperimentale, pari a oltre 0,65 milioni di tonnellate per i 7700 ha analizzati (Uhl et al. 1988). Poco meno della metà di questo carbonio sarebbe contenuto negli ecosistemi forestali con basso e medio grado di deforestazione (tabella 4). Tuttavia, un territorio perfettamente integro sarebbe capace di un sequestro di carbonio potenzialmente doppio, arrivando intorno ad 1.3 milioni di tonnellate di carbonio. Nell'ipotesi di una rigorosa applicazione dell'attuale legge federale della “*riserva legale*”, i programmi per il recupero forestale devono essere realizzati limitando qualsiasi produzione agraria al 20% dell'area degradata, consentendo un ripristino forestale pari all'80% della superficie. Sotto tali circostanze, è stimabile uno carbon stock potenziale superiore a 1.0 milioni di tonnellate.

Tabella 4. Stima della biomassa totale in termini della sostanza secca. A = Area parziale; A_T = Area totale. I dati di biomassa per ha della foresta primaria e delle superfici deforestate sono tratti da Uhl et al. (1988). Le aree deforestate sono assimilate a superfici a pascolo brado nella loro interezza. Le aree a basso grado di deforestazione, quelle con grado medio e quelle con grado elevato sono considerate rispettivamente a 80%, 50% e 30% del potenziale di accumolo di biomassa.

Grado di deforestazione	Area (ha)	A/A _T (%)	Biomassa/ha (t ha ⁻¹)	Biomassa Totale (Mt)
Area con foresta non alterata	1374.87	18%	350	0.4812
Area con grado deforestazione basso	2194.43	28%	280	0.6144
Area con grado deforestazione medio	1462.43	19%	175	0.2559
Area con grado deforestazione elevato	821.95	11%	105	0.0863
Aree completamente deforestate	1868.41	24%	15	0.0280
Area campione	7722.09	100%	175	1.4658

Modello per il recupero dell'area degradata di Moju

Il modello proposto per il recupero dell'area degradata di Moju (fig. 6), è ideato per massimizzare le prospettive per il recupero e la conservazione della biodiversità locale, ma per minimizzare i costi degli impianti. L'intervento, inoltre, è progettato in maniera modulare, in modo da essere

dilazionabile su di un arco temporale finanziariamente sostenibile per i soggetti che, a vario titolo, possono essere gravati dagli oneri del recupero. Si tratta di strategie progettuali finalizzate al ripristino delle biocenosi forestali nelle aree a pascolo brado abbandonate o da riconvertire secondo il principio della riserva legale. L'azione è mirata ad aree di recupero di riserva legale, attraverso l'impostazione di reti ecologiche capaci di stimolare processi di successione verso forme resilienti di foresta pluviale secondaria.

L'argomento del restauro forestale in ambienti amazzonici ha origine relativamente recente, con la nascita a partire dagli anni '70 dell'ecologia restaurativa (Young et al. 2005; Halle 2007). Le strategie di recupero degli ecosistemi forestali amazzonici si sono gradualmente evolute negli anni, sulla base di esperienze e teorie ecologiche differenziate. Si è così passati dai primi tentativi empirici di impianti protettivi a scarsa biodiversità, ad impianti basati sulle più attuali conoscenze di biologia conservazionistica, finalizzati al massimo recupero delle funzioni ecosistemiche e dei contenuti di biodiversità. Le moderne acquisizioni scientifiche in materia trovano, tuttavia, forti limiti applicativi nell'onerosità degli interventi di recupero.

Sulla base del lavoro pregresso di analisi territoriale dell'area di Moju, il quadro allarmante del degrado ambientale è, sia pure parzialmente, mitigato dalla permanenza di frammenti di foresta, sia di terraferma che di *varzea*. Accanto a relitti di foresta primaria è presente un mosaico non irrilevante di foresta secondaria e di *capoeira* con diversi gradi di sviluppo successionale. Questo quadro lascia presumere un livello medio di capacità di autorecupero ambientale così come di potenziale di dispersione di semi e propaguli di varia natura dalle aree nodali. Le aree nodali sarebbero costituite dai frammenti forestali sopravvissuti agli incipienti cambiamenti d'uso del suolo dell'area (fig. 6). L'intervento è inteso a creare una prima e graduale riconnessione dei frammenti di foresta, a partire dalle aree da destinarsi alla riserva legale. Tale ricucitura sfrutterebbe il concetto del corridoio ecologico. Il corridoio ecologico tra due frammenti di foresta prevede una fascia di impianto arboreo lineare da realizzarsi su aree attualmente utilizzate ad allevamento brado. Il graduale infittirsi degli elementi lineari è inteso a ricreare una micro-rete ecologica sulla scala della fazenda. Il cessato disturbo da pascolamento e la presenza di un primo stadio successionale di margine verso la ricostituzione della foresta, innescherebbero le funzioni ecosistemiche essenziali al reinsediamento della foresta stessa (Schlawin e Zahawi, 2008) ed al recupero spontaneo della sua biodiversità. In accordo a quanto elaborato da Rodrigues et al. (2009) per quanto concerne il recupero di altre ecoregioni amazzoniche severamente a rischio, il modello di recupero proposto si articola su di una serie di azioni: rimozione delle cause di degrado; gestione dei processi di dispersione dei semi di essenze forestali; gestione vivaistica della rigenerazione di essenze locali; accelerazione dei processi successionali attraverso trapianto in loco di giovani piante arbustive ed arboree; eventuali risarcimenti di fallanze nel reticolo di recupero. Si tratta, evidentemente, di una

serie di operazioni che vanno concertate nello sviluppo di adeguate attività di reperimento, allevamento e reintroduzione del germoplasma locale.

È prevista una modularità del ripristino, orientata alla graduale realizzazione di reticoli di connessione dei frammenti forestali residui. In questo modo l'intervento sarebbe capace di influenzare superfici vaste, pur limitandosi a superfici proporzionalmente assai minori ma di grande sviluppo lineare.

Il modello teorico prevede un appezzamento ideale di 200 ha, ad es. un rettangolo di 2000 m x 1000 m = $2 \times 10^6 \text{ m}^2$, suddiviso dalle due altezze mediane in 4 comparti da 50 ha ciascuno. L'impianto con essenze arboree e palme locali lungo le linee mediane, viene a realizzare i corridoi di connessione primari con il mosaico forestale circostante. Ipotizzando una larghezza dell'elemento lineare pari a 10 m, si ottiene un investimento di superficie per i due corridoi ecologici pari a 30,000 m^2 , ovvero l'1.5% della superficie a riserva legale di 200 ha. Il punto di intersezione delle 2 fasce di connessione viene a costituire un nucleo di riforestazione di 4 ha, pari al 2% della superficie totale di riserva. L'intervento iniziale riguarderebbe, dunque, 7 ha di impianto forestale su di un totale di 200 ha da recuperare a riserva legale, pari al 3.5% della superficie complessiva.

L'impianto prevede l'uso di specie autoctone e, per quanto possibile, di provenienze locali. In particolare, i criteri di scelta delle specie sono orientati a creare, sia nelle fasce lineari (corridoi) che nelle aree nodali (core area), una diversità strutturale e funzionale della consociazione. Specie azoto-fissatrici sono prese in considerazione per rigenerare un substrato di fertilità essenziale per il recupero di una biocenosi forestale. Diverse strutture aeree, con specie più basse ai margini e con maggiore accrescimento al centro, devono essere prese in considerazione per aumentare il grado di complessità del profilo verticale della biocenosi. Il criterio strutturale è particolarmente mirato ad aumentare l'attrazione di specie animali (uccelli e mammiferi) utili alla dispersione naturale di semi provenienti dai frammenti di foreste primarie e secondarie circostanti. Ulteriore criterio riguarda l'utilità economica e sociale, accanto a quella ecologica, delle specie da utilizzare nell'impianto. Specie oleaginose e fruttifere potrebbero portare, attraverso attività di raccolta compatibili con la riserva legale, ad un'integrazione di reddito per le popolazioni rurali (cablocos) e ripariali (riberinhos) dell'area di Moju. Questo tipo di approccio consentirebbe di stimolare la partecipazione locale al progetto.

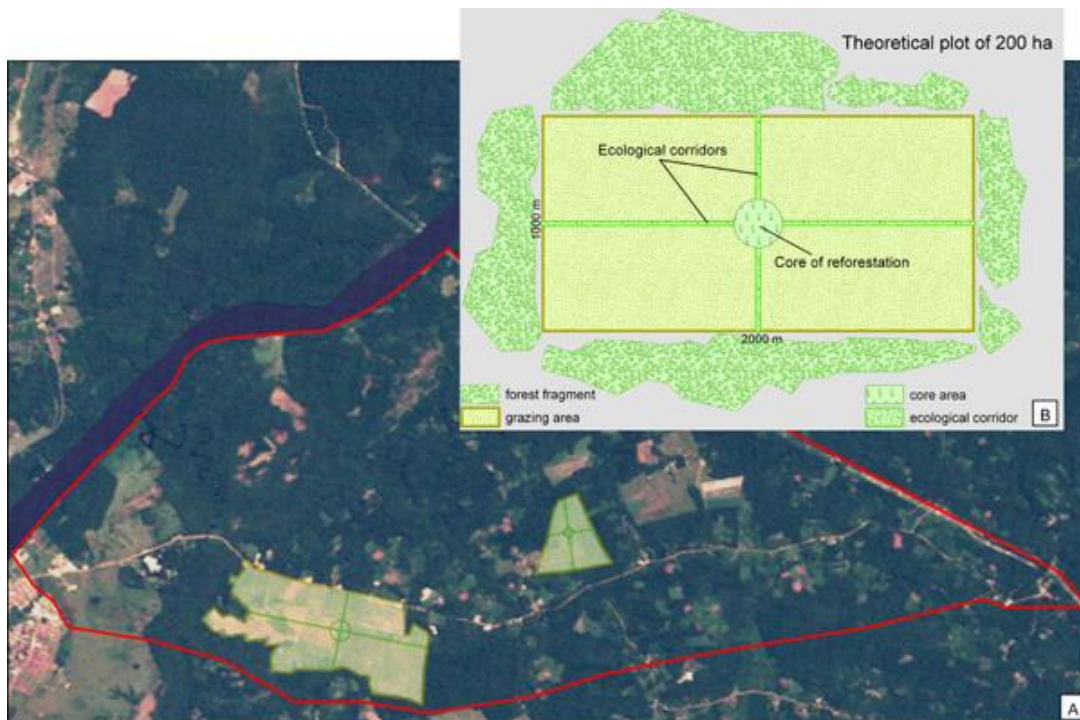


Fig. 6 – Modello per il recupero del degrado forestale nel sito sperimentale.

2.4 Discussione

La questione del recupero delle aree di degrado coinvolge molte delle ecoregioni amazzoniche, con diversi livelli di problematiche. L'area di Moju è in questo emblematica, trattandosi di una regione con fortissimo impatto antropico. Tra i principali elementi critici della regione si possono riconoscere il pascolo estensivo, lo sfruttamento incontrollato delle foreste e l'attuale modello fondiario. In questa regione le dinamiche di antropizzazione sono fortemente cresciute nel corso degli ultimi decenni lasciando il territorio in uno stato di degrado e frammentazione e ponendo in seria crisi la funzionalità delle reti ecologiche.

In questo studio sono state integrate diverse metodologie: interpretazione immagini satellitari e analisi spaziali per la stima della deforestazione, per l'analisi della copertura e uso del suolo del sito sperimentale, finalizzate alla stima della capacità del sequestro di carbonio; metodi di ecologia del paesaggio per l'identificazione di pattern spaziali della struttura paesaggistica; strategie per il recupero forestale. Questo approccio di studio integrato si è rivelato idoneo alla pianificazione di interventi mirati al recupero dell'area degradata di Moju.

In sintesi è stato stimato per il municipio di Moju un incremento della deforestazione del 6% tra il 2001 e il 2008, sebbene la velocità di deforestazione sia lievemente diminuita. Al 2008 oltre il 40% del territorio municipale risultava deforestato, con una perdita annua di superficie forestale pari a 90-100 km². I principali pattern spaziali riscontrati nelle immagini del 2008, eterogenei per forma e

dimensioni, sono stati associati a diverse tipologie di uso del suolo: dai piccolissimi appezzamenti per una produzione agricola di sussistenza familiare, ad elementi molto grandi, utilizzati per coltivazioni intensive o per l'allevamento brado del bestiame. La lieve diminuzione dei valori medi dell'indice NDVI e l'incremento dell'eterogenità spaziale dei valori di NDVI, osservati nell'arco temporale 1984 - 2008, testimoniano i fenomeni di degrado e di frammentazione che la copertura forestale ha subito, evidenziando l'espansione di aree deforestate. Questi risultati indicano che il municipio di Moju nel corso degli ultimi decenni è stato sottoposto ad un uso non sostenibile del territorio, che ha prodotto una costante perdita annuale di foresta primaria, degradazione degli habitat, cambiamenti nell'uso del suolo, aumento delle emissioni di carbonio nell'atmosfera e frammentazione della matrice paesaggistica. Pertanto sono necessarie strategie e pianificazioni di conversione d'uso verso tipologie agroforestali rispettose dei principi di sostenibilità e di recupero ambientale.

L'analisi territoriale dell'area di Moju ha evidenziato un allarmante stato di degrado ambientale. Tuttavia la permanenza di frammenti di foresta ha offerto lo spunto per ideare il modello per il recupero dell'area degradata di Moju. Le strategie proposte sono finalizzate al ripristino delle biocenosi forestali nelle aree a pascolo brado abbandonate o da riconvertire. La pianificazione di recupero asseconda il principio della riserva legale, attraverso l'impostazione di reti ecologiche locali, capaci di stimolare processi di successione verso forme resilienti di foresta pluviale secondaria.

In conclusione questo studio testimonia come i dati di natura spaziale, accessibili on line, e l'uso delle analisi spaziali contribuiscano efficacemente alla predisposizione di piani di sviluppo economico, conservazione e ripristino dei contenuti di biodiversità. L'approccio proposto, così, è di base per la formulazione di modelli ecologici di valenza sia locale che globale, con potenziali effetti positivi sul bilancio del carbonio a scala bioregionale.

3. Secondo caso di studio - Analisi spaziali nella linea di ricerca “Biodiversità ed evoluzione dei popolamenti naturali di *Castanea sativa* in Europa”

Il secondo caso di studio fornisce un contributo alle attività di ricerca volte ad indagare l'origine e i processi che hanno condizionato l'attuale distribuzione di *C. sativa* in Europa. Da molti anni il gruppo di genetica di popolazione dell'IBAF è impegnato nello studio della diversità genetica di *C. sativa* in Europa. Negli ultimi decenni diversi studi hanno contribuito a definire la struttura e la diversità genetica delle popolazioni naturali e coltivate di *C. sativa* per individuare adeguate metodologie per la conservazione della specie (Villani et al. 1999, Martina et al. 2012, Mattioni et al. 2013). Il recente sviluppo della *landscape genetics* ha creato l'esigenza di integrare il classico approccio seguito dai genetisti di popolazione con tecniche di analisi spaziali. L'obiettivo di questo caso di studio è la sperimentazione delle metodiche di analisi previste dalla *landscape genetics* con il supporto della tecnologia GIS e l'impiego delle analisi spaziali.

3.1 Introduzione

Il genere *Castanea*, appartenente alla famiglia *Fagaceae* è ampiamente distribuito nelle foreste caducifoglie dell'emisfero boreale. A questo genere appartengono quattro specie distribuite in tre grandi areali. *C. sativa* è presente in Europa e in tutti i paesi che si affacciano sul Mediterraneo, *C. crenata* in Giappone, *C. mollissima* in Cina, mentre *C. dentata* in America settentrionale.

Studi filogenetici hanno ipotizzato l'origine di questo genere in Asia dove, all'inizio dell'Eocene, si sono diversificate le specie *C. mollissima* e *C. crenata*. In seguito, durante l'Eocene, si è avuta una dispersione intercontinentale che ha portato alla formazione della specie europea *C. sativa* e della specie americana *C. dentata* (Lang et al. 2006). *Castanea sativa* Mill. è l'unica specie del genere *Castanea* che cresce spontaneamente in Europa. Il suo areale di distribuzione va dall'Asia minore all'Europa meridionale (bacino del Mediterraneo), estendendosi dal Mar Caspio all'Atlantico, giungendo a nord fino all'Inghilterra meridionale.

La storia evolutiva del castagno è stata influenzata da vari fattori tra i quali i meccanismi e la modalità di dispersione, i processi di diversificazione genetica, la posizione geografica dei rifugi durante le glaciazioni e la presenza di barriere geografiche e la loro posizione. La presenza di aree rifugio, particolarmente favorevoli alla sopravvivenza delle specie, ha giocato un importante ruolo nel dinamismo della vegetazione durante i periodi interglaciali del Pleistocene nell'Europa temperata (Cheddadi et al. 2005; Tzedakis 2007, 2009). Gli attuali patterns di diversità genetica sono stati fortemente influenzati dalla localizzazione dei rifugi glaciali (Petit et al. 2003; Hampe & Petit 2005). Queste aree sono state individuate spesso in regioni montane dell'Europa meridionale,

situate a basse e medie latitudini ed ai margini delle catene montuose (Krebs et al. 2004), caratterizzate da un'alta diversità di habitat e dalla disponibilità di riserve idriche anche durante i periodi secchi (raccolta di precipitazione orografica) (Carrión et al. 2003, Tribsch & Schönswetter 2003). Recenti studi sul polline fossile hanno ricostruito la localizzazione delle aree rifugio della specie durante l'ultima glaciazione; queste aree sono state riconosciute in alcune regioni del bacino del Mediterraneo, molto probabilmente, in Italia (margini degli Appennini centro-meridionali, margini delle Prealpi), nella penisola Iberica settentrionale (colline della costa cantabrica, Galizia meridionale e nord del Portogallo), nella regione Balcanica (Grecia meridionale, Macedonia, Bulgaria sud-occidentale), nella regione intorno alla costa meridionale del Mar Nero (Georgia, Turchia, Bulgaria sud-occidentale), lungo la costa mediterranea della Siria e del Libano (Krebs et al. 2004). Krebs et al. (2004) riconoscono la regione Transcaucasica (Caucaso del Sud) come la più probabile zona di rifugio. L'alta variabilità genetica e l'alta divergenza genetica rilevata tra le popolazioni di castagno della Turchia orientale (regione eurosiberiana) e della Turchia occidentale (regione mediterranea) farebbero ipotizzare la presenza di due distinti rifugi glaciali nella due regioni (Villani et al. 1991). Recenti studi genetici (Mattioni et al. 2013) hanno confermato la corrispondenza degli attuali pattern genetici delle popolazioni con la dislocazione dei rifugi ipotizzati da Krebs et al. (2004) tramite il polline fossile. Al termine dell'ultimo periodo glaciale, circa 12.500 anni fa, le specie cominciarono a migrare dalle aree di rifugio e colonizzarono nuovi territori. Anche il castagno iniziò ad espandersi e a colonizzare nuovamente gli altri paesi del Mediterraneo. Dal sud le popolazione si espansero verso nord, dove con il progressivo riscaldamento divennero favorevoli nuovi habitat (Médail & Diadema 2009).

Oltre ai fattori naturali, anche le popolazioni umane hanno influenzato l'attuale distribuzione e diversità delle popolazioni di castagno (Mattioni et al. 2008). Fonti storiche testimoniano come la coltivazione del castagno fosse praticata sin dal III sec. a.C. per la produzione di carbone e di legno per le opere di costruzione, principalmente nelle regioni montuose dell'antica Grecia e dell'Anatolia. Durante l'Impero Romano il castagno fu coltivato e diffuso oltre il suo areale di distribuzione naturale grazie alla sua estrema utilità e versatilità (van Mourik 1985; Santos et al. 2000). Le civiltà dei Greci e dei Romani furono sicuramente importanti nella diffusione dell'utilizzo del castagno, ma il loro impatto nella diffusione delle piante stesse deve essere considerato con cautela, alla luce dei nuovi dati palinologici e genetici (Conedera et al. 2004, Mattioni et al. 2013). Tra l'XI ed il XVI sec. aumentò moltissimo la coltivazione di *C. sativa* a scopo alimentare (Pitte 1986).

La coltivazione in Europa raggiunse il suo picco verso la metà del XX sec. Dopo questo periodo cominciò un lento declino sia per motivi naturali che socio-economici, quali l'abbandono delle aree montane e il cambiamento delle abitudini alimentari.

L'azione antropica ha dunque influenzato le caratteristiche strutturali e genetiche delle popolazioni di castagno nel corso della storia, attraverso la coltivazione intensiva di piante innestate, favorendone la diffusione ed il trapianto di materiale di propagazione, portando infine alla frammentazione delle popolazioni in conseguenza ai cambiamenti d'uso del suolo (Mattioni et al. 2008). Quindi la combinazione di fattori ambientali e antropici ha portato all'attuale distribuzione del castagno europeo. Ma in che modo la colonizzazione naturale sia stata influenzata da quella mediata dall'uomo non è del tutto noto (Mattioni et al. 2008).

C. sativa è, dunque, una specie forestale di grande importanza economica sia per l'utilizzo del legname che per i frutti, ma grande è anche la sua valenza paesaggistica (Martin et al. 2010).

Lo studio della diversità genetica e del flusso genico dei popolamenti naturali di castagno esistenti, in relazione alle variabili ambientali, paesaggistiche ed antropiche può fare luce su queste incertezze.

3.2 Materiali e metodi

In questo studio sono state considerate due distinte tipologie di dati, diversi per natura e provenienza: dati territoriali che costituiscono il dataset spaziale (ad es. immagini satellitari, aeree, modelli digitali del terreno, rilievi gps, dati climatici, ambientali ecc.) e dati genetici multilocus, che costituiscono il dataset alfanumerico.

Collezione di Castanea sativa

Il germoplasma utilizzato per le analisi genetiche fa parte di una ampia collezione conservata nell'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale (IBAF) di Porano. Tale collezione di popolazioni europee di *C. sativa*, provenienti da diversi paesi europei (Italia, Spagna, Grecia, Turchia, Bulgaria e Slovacchia), di cui sono note le coordinate geografiche, ed i dati genetici ad esse associabili, sono stati organizzati in un geodatabase, in ambiente ESRI ArcGIS 9.3.

Dati cartografici di base

I dati cartografici di base sono stati acquisiti direttamente da geospatial data center disponibili sul web. È stato acquisito il modello digitale del terreno GTOPO30, alla risoluzione spaziale di 30 secondi di arco, disponibile al seguente indirizzo internet http://eros.usgs.gov/#/Find_Data/Products_and_Data_Available/GTOPO30. GTOPO30 è un modello digitale di elevazione (dem), relativo all'intero globo terrestre, rappresenta la distribuzione delle quote di un territorio ad una distanza regolare di 30 secondi di arco (circa 1 Km). E' reso disponibile dal data center EROS (Earth Resources Observation and Science) nel 1993. Il sistema di riferimento geografico è WGS84

e la latitudine e la longitudine sono espresse in gradi decimali. I dati sono suddivisi in 33 settori acquisibili separatamente. Per coprire l'area di studio sono stati acquisiti i dati relativi a 4 settori, che coprono un'area geografica compresa tra 20° Ovest e 60° Est in longitudine e tra 0° e 90° Nord in latitudine. I dati sono forniti in formato raster (.DEM) a 16 bit, con celle che misurano 0.0083333x0.0083333 gradi (30 secondi di arco).

I confini amministrativi (limiti di stato, di regione, province ecc.) dei paesi interessati dallo studio, sono forniti da ESRI in formato shapefile (.shp e .lyr).

Analisi landscape genetics

Questo studio è stato condotto integrando i metodi della genetica di popolazione con le analisi statistiche e le più appropriate tecniche di analisi spaziale, seguendo gli innovativi principi della *landscape genetics*. I metodi di studio della *landscape genetics* non sono ancora del tutto definiti e gli studi su specie vegetali sono relativamente poco numerosi se confrontati con quelli su specie animali (Holderegger et al. 2010). L'approccio analitico seguito corrisponde sostanzialmente all'*overlay technique* descritta da Holderegger et al. (2010) per individuare le coincidenze geografiche tra discontinuità e barriere genetiche con elementi del paesaggio. Questa tecnica prevede di:

1. identificare i principali cluster di popolazioni;
2. identificare le barriere e discontinuità genetiche;
3. interpolare variabili genetiche per costruire isolinee genetiche.

Le strutture genetiche identificate sono successivamente sovrapposte a carte topografiche o land cover land use map per cercare le coincidenze geografiche tra le barriere, discontinuità, o isolinee genetiche, con gli elementi del paesaggio.

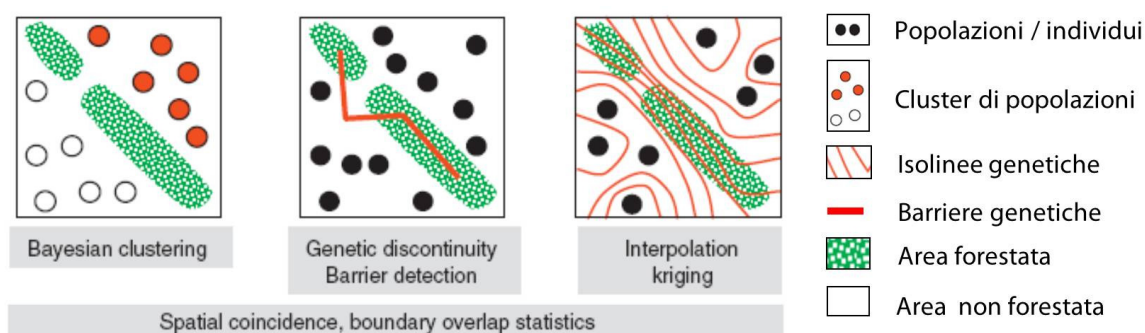


Fig. 1 – Principali fasi di analisi dell'*overlay technique* descritta da Holderegger et al. (2010).

I dati genetici utilizzati sono il risultato di diversi studi condotti dal gruppo di genetica dell'IBAF nel corso degli anni, nell'ambito di diversi progetti di ricerca e collaborazioni internazionali. La

diversità e la divergenza delle popolazioni è stata analizzata utilizzando marcatori molecolari (microsatelliti nucleari SSR) che individuano le differenze a livello di zone ripetute del genoma.

L'analisi statistica dei dati microsatellitari prevede l'utilizzo di diversi software appositamente sviluppati. Il software GenAEx 6.4.1 (Peakall & Smouse 2005) è impiegato per calcolare i principali indici di diversità genetica: numero medio di alleli per locus (A), eterozigosità osservata (H_O), eterozigosità attesa (H_E), eterozigosità attesa pesata sul numero di campioni (UH_E), e numero di alleli privati per singola popolazione. La ricchezza allelica (R_s) e la ricchezza degli alleli privati (PR), che possono essere influenzate dalle dimensioni del campione (El Mousadik & Petit 1996), sono state calcolate con il metodo di rarefazione con il software HP-rare (Kalinowski 2004). Tale metodo stima il numero previsto di alleli e/o alleli privati in un sotto-campione di n individui scelti a caso da un campione di N individui in ogni popolazione. I parametri di diversità genetica, espressi in formato tabellare, sono stati importati, in un geodatabase creato in ambiente ArcGIS 9.3, relativo alle popolazioni di *C. sativa*. Il geodatabase, supportato dal software Microsoft Access, consente un'archiviazione e una gestione centralizzata e ottimizzata di dati spaziali e di dati tabellari. Le popolazioni di castagno, note le coordinate geografiche, sono state salvate nel geodatabase come feature class di punti. Semplici funzioni di *Join* e *Relate table* consentono di relazionare o associare i dati attributo alle feature class. In questo modo qualsiasi funzione di analisi spaziale può essere applicata ai dati attributo relativi ad una data feature class. I valori di eterozigosità attesa (H_E), ricchezza allelica (R_s) e ricchezza degli alleli privati (PR) sono stati interpolati, utilizzando l'estensione Geostatistical Analyst, disponibile in ArcGIS 9.3, per elaborare le mappe della diversità genetica.

La geostatistica fornisce gli strumenti per studiare i fenomeni naturali che si sviluppano su base spaziale, tramite l'analisi statistica di dati campionati sul territorio (Bolstad 2008). Una corretta applicazione delle tecniche geostatistiche prevede la definizione di un modello di riferimento da cui estrapolare le regole necessarie a caratterizzare e stimare i fenomeni in studio (Raspa 1995). Le interpolazione spaziale mirano a predire i valori di una data variabile su un'area d'interesse e in genere vengono tradotte in immagini o mappe (Hengl 2009). Una corretta scelta della funzione geostatistica da impiegare per interpolare una data variabile, è subordinata ad un'attenta esplorazione del dataset in esame necessaria a definire un modello. A tal proposito il software ArcGis 9.3 dispone dell'apposito tool Explore Data, che consente di investigare le proprietà statistiche del dataset. Il primo step prevede l'analisi della distribuzione dei dati, tramite l'istogramma. Il Normal QQ Plot consente di comparare la distribuzione dei dati con una distribuzione normale standard, fornendo un'altra misura della normalità del dato. Se i dati non mostrano una distribuzione normale sia nell'istogramma sia nel Normal QQ Plot è necessario trasformare il dataset e renderlo conforme ad una distribuzione normale, prima di utilizzare una

determinata funzione di interpolazione, attraverso le algoritmi di trasformazioni predisposti. Il secondo step prevede di identificare la presenza o l'assenza di un trend nel dataset. Se esiste un trend nel dataset, la componente deterministica (non casuale) può essere rappresentata da una funzione matematica. Ma se questa funzione non riesce a rappresentare con precisione la superficie per soddisfare determinate necessità, è possibile rimuovere il trend e continuare l'analisi, lavorando sui residui. Ciò significa analizzare le variazioni su un piccolo intervallo lungo la superficie. La trend Analysis proietta ciascun punto del dataset in due piani perpendicolari, uno orientato est-ovest, e l'altro nord-sud, e attraverso delle barre verticali rappresenta la localizzazione e il valore della variabile (altezza della barra) per ogni punto. Attraverso la proiezione dei punti viene ricostruita la curva che meglio approssima la distribuzione dei valori e consente di individuare gli eventuali trend e le specifiche direzioni. Il terzo step invece indaga la presenza di autocorrelazione spaziale tra i valori misurati nei punti di campionamento. L'autocorrelazione assume che le cose più vicine tra loro siano più simili (Dale & Fortin 2009). L'interpretazione del semivariogramma consente di esaminare questo tipo di relazione. Dunque l'esame delle proprietà statistiche del dataset consente di costruire il più appropriato modello di predizione della variabile in esame, necessario nella scelta della funzione di interpolazione. I metodi di interpolazione sono numerosi e ognuno presenta caratteristiche proprie, come la semplicità d'uso, il tempo di elaborazione, la sensibilità alla variazione dei parametri, l'accuratezza della stima ecc. Le principali tecniche di interpolazione si basano su due diversi modelli di predizione spaziale: modelli deterministici e modelli probabilistici (stocastici) (Hengl 2009). La tecnica deterministica consente di creare mappe di superficie a partire dai valori misurati, basata sul grado di similarità o sul grado di *smoothing* tra i punti. Invece la tecnica stocastica è basata su funzioni probabilistiche, e consente di elaborare modelli previsionali di carattere spazio-temporale più complessi, che comprendono anche la stima dell'errore e dell'incertezza associata ad ogni punto predetto della mappe di superficie (ESRI 2001). L'Inverse Distance Weighted (IDW), una delle più diffuse tra le tecniche deterministiche, è basata sull'osservazione sperimentale che il valore della media pesata di un campione in un determinato punto è proporzionale al peso inverso della distanza dei campioni circostanti (Hack 2005). I valori misurati più vicini al punto di predizione hanno un'influenza maggiore di quelli più distanti. Ciò significa che con l'aumentare della distanza il peso diminuisce rapidamente. Invece il Kriging (Krige 1951, Matheron 1962, Cressie 1990, Webster & Oliver 2001), una delle interpolazioni stocastiche più utilizzate, è una tecnica a media pesata mobile, riconducibile per alcuni aspetti all'IDW. Il Kriging oltre a considerare la distanza dei punti di campionamento, rispetto all'IDW, prende in considerazione anche la disposizione di tali punti nello spazio. La stima del valore in un punto non campionato viene fatta mediante l'utilizzo della funzione variogramma, e la configurazione spaziale dei punti di campionamento e rispettivi valori misurati attorno al punto da

stimare (Hengl 2009). L'assunto su cui si basa il kriging prevede che i dati siano parte di un modello stocastico stazionario, e che i dati siano normalmente distribuiti (ESRI 2001). I metodi deterministici (es., IDW), pur essendo meno sofisticati rispetto ai metodi stocastici, sono più semplici e pratici nell'utilizzo e non presentano gli assunti di base restrittivi delle tecniche stocastiche.

In questo studio sono state investigate le proprietà statistiche del dataset e testate le funzioni di interpolazione Kriging e Inverse Distance Weighted. L'errore stimato, inteso come Root Mean Square Prediction Error, si è rivelato più basso per la tecnica IDW. Quindi, i parametri di diversità genetica sono stati interpolati tramite la funzione IDW per derivare le superfici di diversità genetica delle popolazioni in esame.

Diversi approcci statistici possono essere utilizzati per individuare i gruppi di popolazioni o individui, e quindi la struttura genetica delle popolazioni. Tra questi è stato scelto il programma STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000), che segue un approccio Bayesiano combinato con il metodo di simulazione Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Questo metodo individua il numero più probabile di clusters presenti con contemporanea assegnazione degli individui ai medesimi minimizzando il linkage disequilibrium e la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Di norma l'analisi mediante STRUCTURE viene effettuata utilizzando il modello di mescolanza (admixture model) sull'intero set di dati senza fornire informazioni a priori sulle popolazioni e presupponendo correlazione tra le frequenze alleliche. Tale analisi fornisce il numero più probabile di K cluster e il corrispondente coefficiente di "membership" (Q-value), ossia la frazione di genoma che ogni individuo ha ereditato dai vari clusters per popolazione e per individuo. In genere viene testato un range di possibili cluster (K) compreso tra 1 e il numero di popolazioni in esame e si ripete una serie di sei corse indipendenti per ogni possibile K con un periodo di burn-in di 10000 steps seguiti da 105 ripetizioni MCMC. Successivamente si applica la statistica ad-hoc ΔK sviluppata da Evanno et al. (2005) che fornisce il numero più probabile di cluster dedotti mediante approccio Bayesiano. Come dimostrato da Evanno et al. (2005), è possibile identificare in questo modo il più alto livello gerarchico della separazione genetica tra popolazioni. L'algoritmo FullSearch integrato nel software CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson e Rosenberg 2007) permette di mediare le sei corse per il numero più probabile di cluster; infine, mediante il software DISTRUCT (Rosenberg 2004) è possibile visualizzare graficamente la corrispondente matrice dei valori di Q. Successivamente è possibile elaborare separatamente i gruppi dedotti da una prima analisi di STRUCTURE, al fine di individuare possibili sottostrutture.

Seguendo l'approccio descritto da Murphy et al. (2008), il coefficiente di membership Q-value per popolazione, fornito da STRUCTURE 2.3.3 per il numero di K cluster più probabile, è stato interpolato utilizzando la più appropriata funzione geostatistica (Inverse Distance Weighting (IDW)),

Kriging) disponibili nel software ArcGIS 9.3. Questo metodo consente di elaborare le K clustering surface map, ossia le superfici di probabile appartenenza delle popolazioni ai K cluster più probabili per l'areale di distribuzione delle specie in esame. Queste mappe offrono una rappresentazione spazialmente esplicita della struttura genetica delle popolazioni in esame, un nuovo modo di visualizzare i risultati delle tradizionali tecniche di genetica di popolazione.

Il software BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), basato sull'algoritmo *maximum difference* di Monmonier, è stato utilizzato per individuare le probabili barriere genetiche. Le linee di discontinuità genetica sono elaborate dal programma sulla base della triangolazione di Delauney (network di connessione tra le coordinate geografiche delle popolazioni) e la risultante tessellazione di Voronoï. Ad ogni spigolo dei poligoni di Voronoï viene associato il valore della corrispettiva distanza genetica di Nei (D_A) tra coppie di popolazioni, calcolata con la funzione GENDIST del software PHYLIP (Felsenstein 2005). La procedura inizia a tracciare un *boundary* lungo lo spigolo al quale è associato il valore più elevato di D_A tra due popolazioni, poi lo estende al successivo spigolo al quale è associato il secondo valore D_A più elevato. Questo processo si ripete finché il *boundary* in costruzione non raggiunge un'altro *boundary* o il limite esterno della *network*. La procedura individua in progressione gerarchica molteplici barriere genetiche. La significatività di queste è testata mediante 100 matrici della distanza di Nei ricampionate, calcolate usando i software SEQBOOT, GENDIST e PHYLIP.

Il modulo Geostatistical Analyst dispone di una funzione che consente di ricostruire la poligonazione di Voronoï, partendo dalle coordinate delle popolazioni. Su questa base sono state digitalizzate le barriere genetiche calcolate dal software BARRIER, secondo il livello gerarchico di derivazione. Le discontinuità genetiche, così ricostruite, sono state sovrapposte al modello digitale del terreno (GTOPO30), per valutare le eventuali coincidenze spaziali tra queste strutture genetiche e gli elementi del paesaggio.

3.3 Risultati

3.3.1 Popolazioni Europee di *C. sativa*

Dalla collezione europea di popolazioni di *C. sativa* ne sono state selezionate 19 (tabella 1) provenienti da Pellice e Natisone (Nord Italia), Sila Piccola e Madonie (Sud Italia), Grecia (Holomontas, Hortiatis), Turchia (Akçakoca e Giresun della Turchia orientale; Golcuk e Cinarcik della Turchia centrale; Kemalpaşa e Demirci della Turchia occidentale), Slovacchia (Modry, Jelenec, Casta, Bratislava, Modra) e Bulgaria meridionale (Belasitsa, Slavyanka).

I valori di eterozigosità attesa (H_E), ricchezza allelica (R_s) e ricchezza degli alleli privati (PR) sono stati interpolati tramite la funzione IDW per derivare le rispettive mappe di diversità genetica

(fig.2). Le popolazioni turche orientali mostrano i valori più elevati di ricchezza allelica e di ricchezza degli alleli privati, seguite dalle popolazioni della Turchia occidentale; quest'ultime mostrano valori piuttosto elevati dell'eterozigosità attesa.

Tabella 1 – Popolazioni Europee di *C. sativa*. Nazione, regione o provincia di provenienza, sito di campionamento, identificativo popolazione, coordinate geografiche, numero di individui campionati.

Nazione	Regione	Popolazioni	ID	Lat.	Long	N
Italia	Sicilia	Madonie	IT01	37°49'56" N	14°05' 12"E	26
Italia	Calabria	Sila Piccola	IT02	39°02'55" N	16°43' 03"E	26
Italia	Piemonte	V. Pellice	IT08	44°48'02" N	07°08' 17"E	26
Italia	Friuli	V. del Natisone	IT09	46°07'17" N	13°33' 19"E	26
Grecia	S-E-Macedonia	Holomontas	GR01	40°32'01" N	23°44' 44"E	26
Grecia	C-Macedonia	Hortiatiss	GR02	40°35'40" N	22°22' 50"E	26
Turchia Orientale	Duzce	Akcakoca	TR01	41°05'15" N	31°07'25" E	24
Turchia Orientale	Giresun	Giresun	TR05	40°54'24" N	38°31'22" E	26
Turchia Centrale	Yalova	Cinarcik	TR08	40°38'42" N	29°07'12" E	26
Turchia Centrale	Kocaeli	Golcuk	TR09	40°43'20" N	29°48'54" E	25
Turchia Occidentale	Izmir	Kemalpasa	TR13	38°26'07" N	27°15'44" E	23
Turchia Occidentale	Manisa	Demirci	TR14	39°02'41" N	28°39'01" E	22
Slovacchia	Banska Bystrica	Modrý Kameň	SK01	48°14'27" N	19°19'49" E	27
Slovacchia	Nitra	Jelenec	SK02	48°24'41" N	18°13'19" E	22
Slovacchia	Bratislava	Častá	SK03	48°24'10" N	17°21'29" E	20
Slovacchia	Bratislava	Bratislava	SK04	48°10'23" N	17°06'33" E	13
Slovacchia	Bratislava	Modra	SK05	48°20'26" N	17°17'19" E	10
Bulgaria	Blagoevgrad	Belasitsa mountain	BU01	41°21'56" N	23°11'59" E	211
Bulgaria	Blagoevgrad	Slavyanka mountain	BU02	41°24'52" N	23°31'32" E	21

L'analisi condotta con STRUCTURE 2.3.3 mostra che le popolazioni esaminate possono essere separate con maggiore probabilità in due distinti gruppi e quindi il numero più probabile di cluster (K) è 2. Altri due raggruppamenti probabili sono K=3 e K=6. La suddivisione delle popolazioni in esame in 6 cluster risulta la più interessante e rappresentativa. Seguendo l'approccio descritto da Murphy et al. (2008), il coefficiente di membership Q-value per popolazione, fornito da STRUCTURE 2.3.3 per K=6 (fig. 3), è stato interpolato utilizzando la funzione IDW disponibile in ArcGIS 9.3, che in questo caso meglio risponde al modello di predizione. Sono state prodotte le K clustering surface map, ossia le mappe di probabile appartenenza delle popolazioni ai 6 cluster per l'areale di distribuzione delle specie in esame (fig.4) e confrontate con i profili genetici multilocus

elaborati con STRUCTURE 2.3.3 (fig.3). Le clustering surface map rappresentano la struttura genetica spazialmente esplicita delle popolazioni in esame, e consentono di visualizzare i risultati di STRUCTURE su una base geografica. Dalla lettura combinata delle figure 3 e 4 emerge che Belasitsa (Bulgaria) e Hortiatis (Grecia) sono raggruppate nel cluster 1 (colore viola, sul profilo genetico), sia Belasitsa che Slavyanka (Bulgaria) appartengono al cluster 2 (giallo) e sono considerate in parte affini alla popolazione della Turchia centrale Cinarcik (colore arancione, giallo); nel cluster 3 sono raggruppate le popolazioni italiane, e la similarità genetica è chiaramente maggiore tra le popolazioni meridionali. Le popolazioni slovacche sono raggruppate nel cluster 4 (verde) sebbene ci sia una diversificazione tra Jelenec e Modry Kamen (verde prevalente) e Modra, Bratislava e Casta (verde e rosso). Nel cluster 5 sono presenti le popolazioni turche orientali e centrali (arancione), Golcuk mostra maggiore similarità genetica con le popolazioni orientali rispetto alle altre della Turchia centrale. Infine il cluster 6 indica la vicinanza genetica tra le popolazioni della Turchia occidentale e quelle della Grecia, in particolar modo Holomontas.

Le barriere genetiche identificate tramite il software BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), sono state rappresentate in ambiente ArcGIS 9.3, sulla base della tessellazione di Voronoï, e classificate in base al livello gerarchico di derivazione. I siti di campionamento, i poligoni di Voronoï e le barriere genetiche sono state infine sovrapposte al modello digitale del terreno (GTOPO30, con una risoluzione spaziale a 30 secondi di arco), per mettere in evidenza le eventuali coincidenze con barriere geografiche (fig.5).

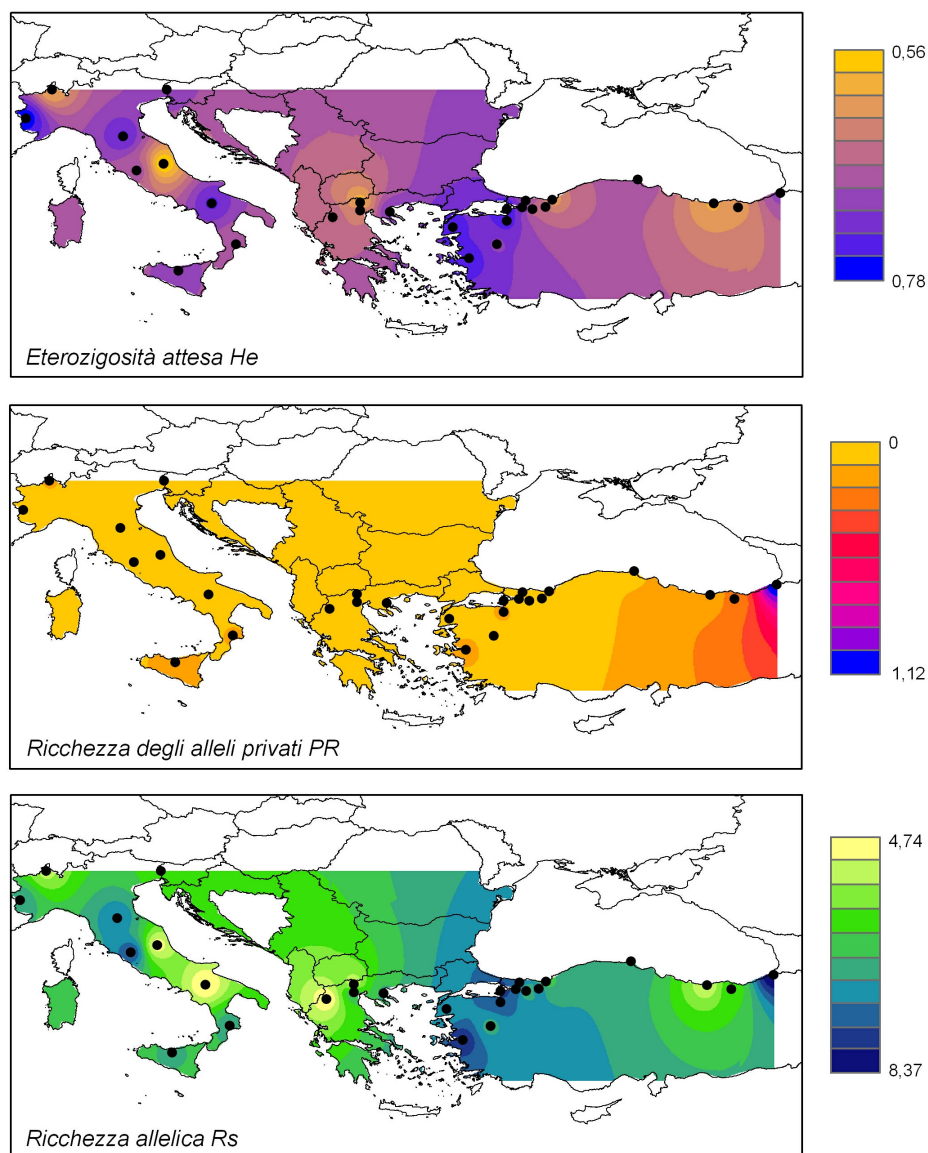


Fig. 2 – Diversità genetica delle popolazioni di *C. sativa*, calcolata tramite interpolazione dei valori di ricchezza allelica (R_s), di ricchezza degli alleli privati (PR) e dell'eterozigosità attesa (H_e).

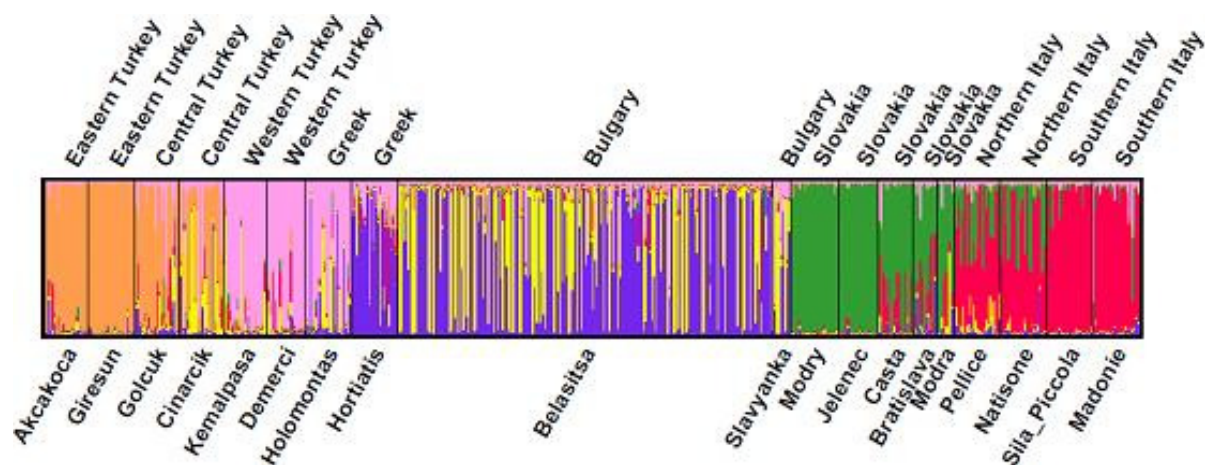


Fig. 3 – Profilo genetico dei singoli individui elaborati con STRUCTURE 2.3.3, per $K=6$

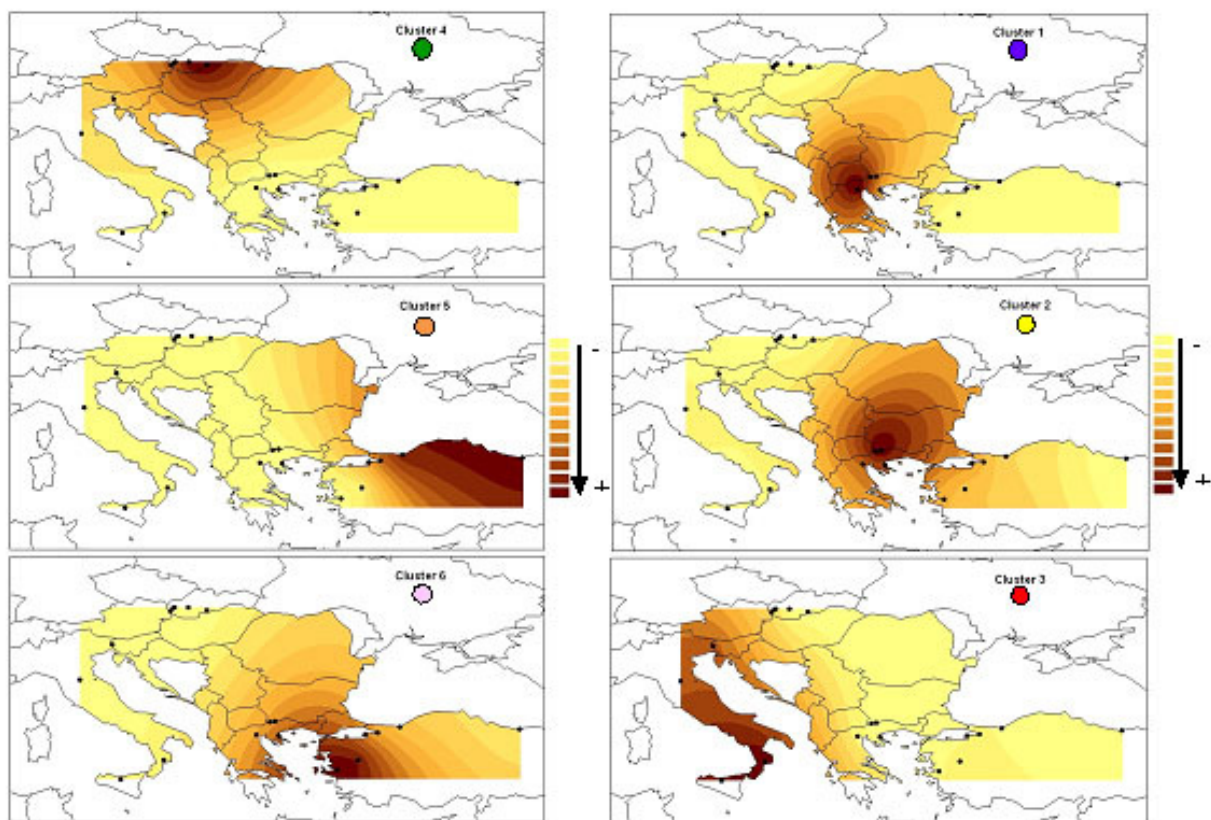


Fig. 4 – Clustering surface map per $K = 6$, mappe di probabile appartenenza delle popolazioni ai 6 cluster stimati con STRUCTURE. I pallini colorati corrispondono ai colori dei profili genetici elaborati con STRUCTURE rappresentati in fig. 3.

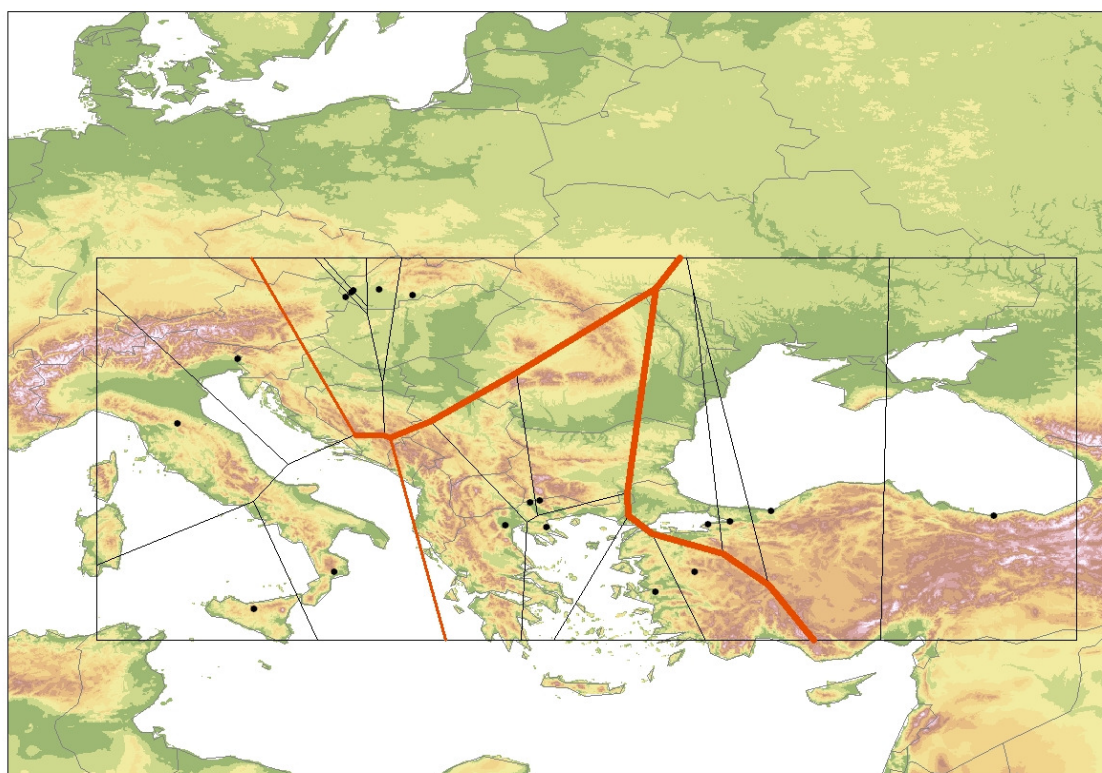


Fig. 5 – Barriere genetiche statisticamente significative, identificate tra le 19 popolazioni di *C. sativa* con il software BARRIER.

3.3.2 Popolazioni Bulgare di *C. sativa*

Uno studio di maggior dettaglio è stato condotto su sei popolazioni bulgare provenienti da sei differenti siti di campionamento (tabella 2), che coprono l'attuale distribuzione di *C. sativa* in Bulgaria, per un totale di 336 individui. In Bulgaria il Castagno è prevalentemente distribuito nel settore occidentale del paese e copre una superficie totale di circa 3000 ha. La presenza di *C. sativa* è rilevante nei versanti settentrionali delle montagne di Belasitsa e Slavyanka, sui versanti meridionali delle montagne Ograzhden, Pirin e dei Balcani occidentali, vicino alla città di Berkovitsa (Red Data Book della Repubblica di Bulgaria).

Tabella 2 – Popolazioni Bulgare di *C. sativa*. Sito di campionamento, coordinate geografiche, identificativo popolazione, numero di individui campionati.

Popolazioni	Lat.	Long.	ID	N
Belasitsa	41°21'57"N	23°12'00"E	BL	211
Slavyanka	41°24'53"N	23°31'33"E	SL	21
Brejani	41°50'48"N	23°11'59"E	BR	20
Zlatolist	41°30'41"N	23°24'38"E	ZL	21
Ograjden	41°27'40"N	23° 0'15"E	OG	42
Berkovitsa	43°12'48"N	23° 6'34"E	BK	21

L'analisi mediante STRUCTURE 2.3.3. ha individuato il numero più probabile di cluster $k=3$ in cui sono raggruppati gli individui di *C. sativa* appartenenti alle sei popolazioni in esame. I valori di appartenenza (Q membership) attribuiscono la popolazione Slavyanka al cluster 1 (rosso), la popolazione Brejani al cluster 2 (blue). Invece gli individui di Belasitsa, Zlatolist, Ograjden e Berkovitsa mostrano admixture di genotipi con valori di Q appartenenti in diversa misura al cluster 1, al cluster 2 e al cluster 3 (verde) (fig. 6).

Il valore di Q di ogni individuo è stato interpolato tramite la funzione IDW per costruire le clustering surface map per $k=3$. In figura 7 le tre mappe relative a ciascun cluster di appartenenza sono state rappresentate con lo stesso colore utilizzato per distinguere i tre cluster nel profilo genetico di STRUCTURE (figura 6). Al colore più intenso corrisponde una similarità genetica più elevata tra gli individui e le relative popolazioni appartenenti allo stesso cluster, degradando fino al bianco la similarità genetica diminuisce. La figura 7A mostra il primo cluster, in cui si trovano Slavyanka e Ograjden, la figura 7B il secondo cluster, che include Brejani e in parte Zlatolist, la figura 7C mostra il terzo cluster. Una rappresentazione ancora più efficace della struttura genetica spazialmente esplicita delle popolazioni bulgare di castagno è mostrata in figura 7D. La mappa di

sintesi delle tre clustering surface map deriva dall'operazione *Composite Bands*, disponibile nel *Data Management Tools* di *ArcToolbox* (ArcGIS 9.3). La funzione *Composite Bands* crea un singolo raster dataset partendo da più bande, o singoli raster. Ad ogni punto della figura corrisponde una componente del cluster 1, del cluster 2 e del cluster 3. In altre parole scegliendo un punto (presunta popolazione) sulla superficie rappresentata, è possibile conoscere in che percentuale essa appartiene al cluster 1, al cluster 2 e al cluster 3 in quel punto. In questa figura è evidente la netta separazione di Slavyanka in rosso e di Brejani in blue. Ograjden (colore aranciato) mostra una prevalenza della componente rossa (cluster 1) e minore di blue e verde (cluster 2 e 3), Zlatolist (colore violetto) una prevalenza di admixture tra blue e rosso, mentre Slavyanka e Berkovitsa mostrano un admixture delle tre componenti, con una debole prevalenza del verde.

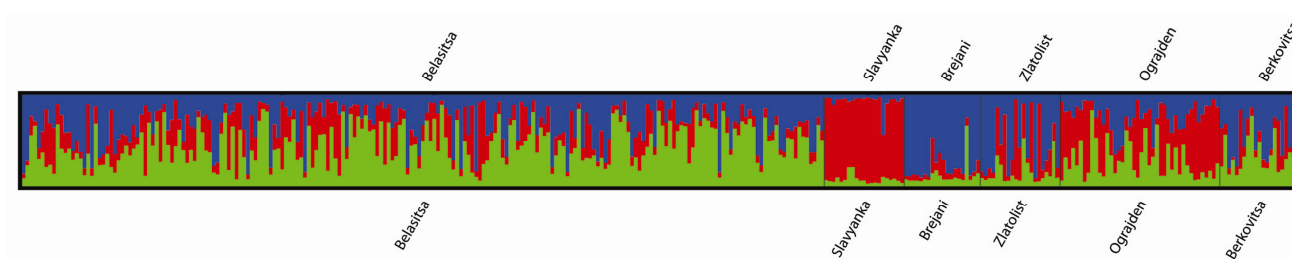


Fig. 6 – Profilo genetico di STRUCTURE per le sei popolazioni bulgare di *C. sativa*. (cluster 1 in rosso, cluster 2 in blue, cluster 3 in verde).

Le due principali barriere genetiche individuate con BARRIER sono state sovrapposte topologicamente al modello digitale del terreno per individuare l'eventuale coincidenza con elementi del paesaggio. La principale discontinuità (A) (fig. 9) separa Slavyanka dalle altre popolazioni, mentre la seconda barriera (B) in ordine gerarchico separa Zlatolist da Brejani.

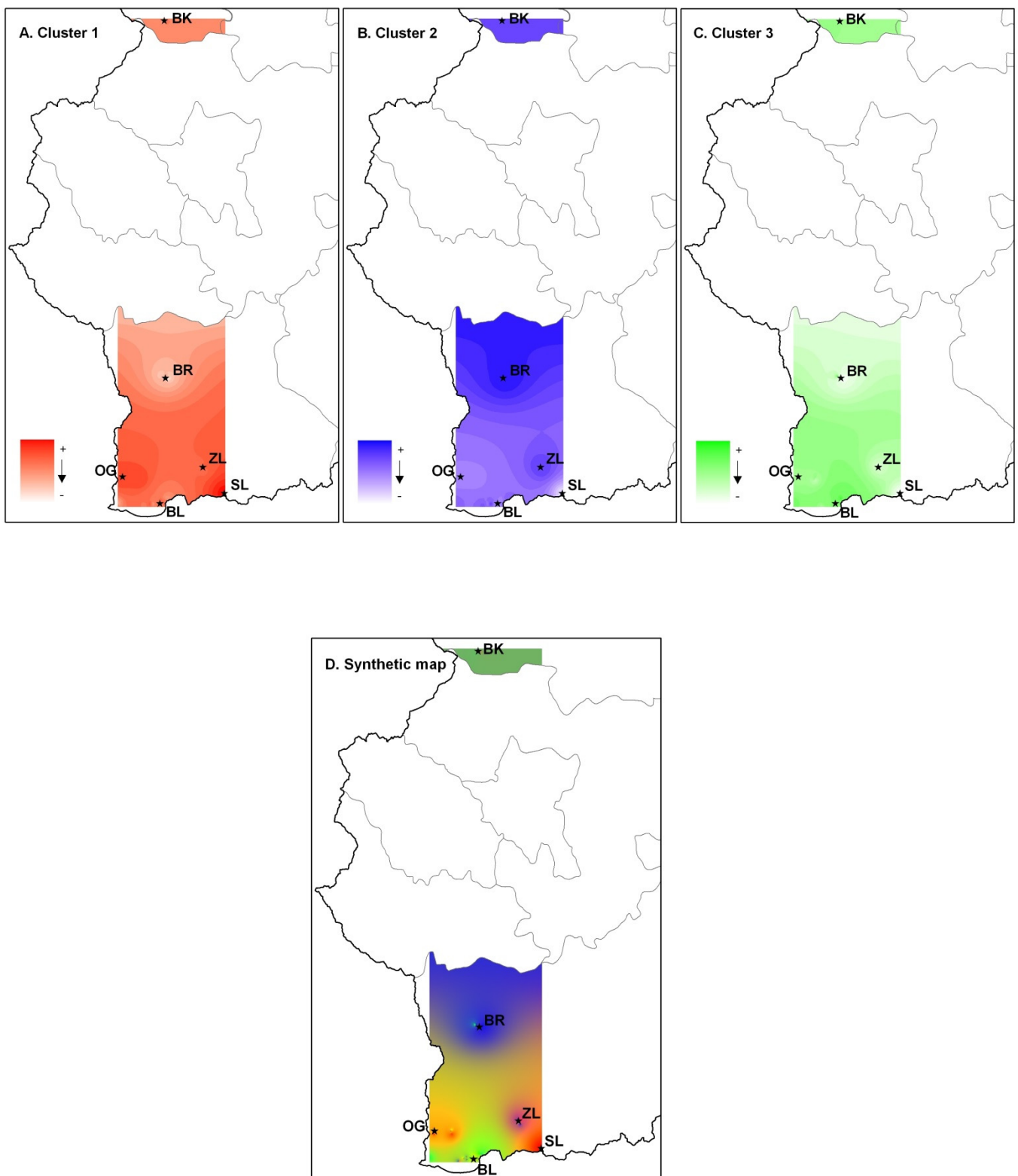


Fig. 7 – Clustering surface map per $K = 3$, mappe di probabile appartenenza degli individui ai 3 cluster stimati con STRUCTURE. (A) cluster 1, (B) cluster 2 e (D) cluster 3. I colori dei tre cluster corrispondono ai colori del profilo genetico rappresentato in fig. 6. (D) Mappa di sintesi. (BL Belasitsa, SL Slavyanka, BR Brejani, ZL Zlatolist, OG Ograjden, BK Berkovitsa).

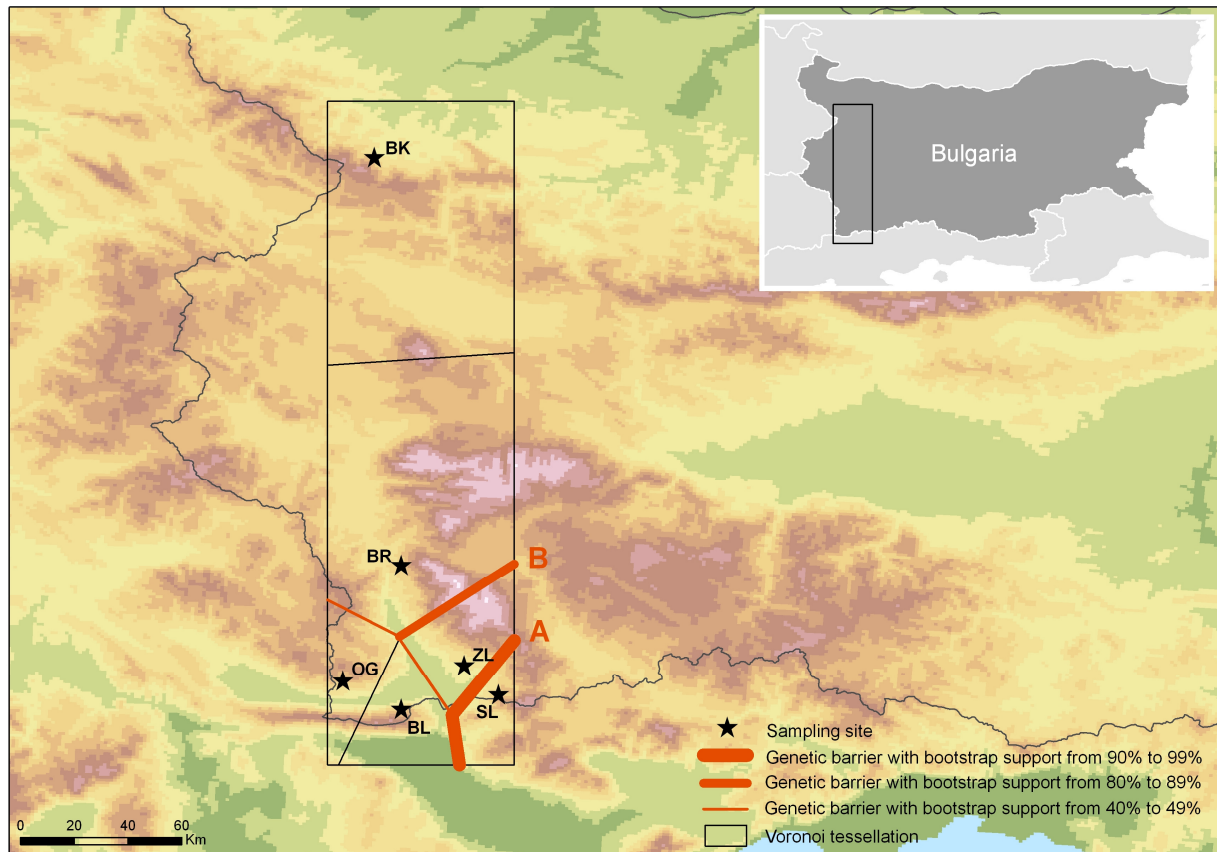


Fig. 8 – Barriere genetiche statisticamente significative, identificate tra le 6 popolazioni bulgare di *C. sativa* con il software BARRIER.

3.4 Discussione

La combinazione delle analisi geostatistiche e l'analisi della struttura genetica, secondo un approccio bayesiano, hanno consentito di individuare una ben definita struttura genetica e evidenti discontinuità genetiche tra le popolazioni di *C. sativa*, prese in considerazione in questo caso di studio. L'analisi della struttura genetica mostra una suddivisione delle popolazioni europee di *C. sativa* in sei cluster principali. Questi risultati sembrano concordare con quanto individuato da Krebs et al. (2004) (fig. 9), studiando i pollini fossili. Secondo questi autori alcune grandi aree rifugio avrebbero favorito la sopravvivenza del castagno europeo durante l'ultimo periodo glaciale. Da queste aree sarebbe poi ripartita la colonizzazione di *C. Sativa* verso nuovi territori. Il cluster 1 (in viola) corrisponde alla zona rifugio individuata da Krebs et al. (2004) nella penisola balcanica, con centro nella Grecia meridionale, Macedonia e Bulgaria. Il cluster 2 (in giallo) sembra invece corrispondere ad un'altra zona ad alta probabilità di rifugio, individuata tra la costa meridionale del Mar Nero, il Bosforo e la Bulgaria sud-orientale. Il cluster 3 che raggruppa le popolazioni italiane ben si allinea con i risultati di Krebs et al. (2004) che indica per l'Italia tre probabili rifugi (Mattioni

et al 2008, Martin et al. 2010). Infine la suddivisione in due pool genici distinti delle popolazioni turche orientali (in arancione) e occidentali (in rosa), avvalorata l'ipotesi dell'esistenza di due distinti rifugi glaciali, ipotizzati da Krebs et al. (2004), dai quali si sarebbero originate queste popolazioni. Mentre le popolazioni turche centrali mostrano un assetto genotipico decisamente ibrido. Permangono difficoltà nell'ipotizzare l'origine delle popolazioni slovacche, raggruppate nel cluster 4, per la mancanza di dati palinologici. L'affinità genetica con le popolazioni italiane può far supporre un'espansione di queste dall'area rifugio, prossima alle Alpi meridionali, verso l'Europa Centrale. Anche i risultati dell'analisi della diversità genetica confermano la corrispondenza tra i principali centri di diversità genetica per il castagno e le zone rifugio individuate nell'area mediterranea. L'identificazione di presunte barriere genetiche può essere solo parzialmente ascrivibile alla presenza di reali barriere geografiche, che avrebbero ostacolato il flusso genico tra le popolazioni studiate.

L'*overlay technique* seguita, nell'applicazione degli innovativi principi della landscape genetics, suggerisce che l'attuale distribuzione e diversità delle risorse genetiche di castagno è stata influenzata sia da fattori naturali (localizzazione dei rifugi glaciali, presenza di barriere geografiche) che antropici.

Da questo caso di studio emergono le seguenti considerazioni. Il continuo sviluppo tecnologico e di software specializzati nell'analisi statistica dei dati genetici ha portato molti cambiamenti in studi di genetica di popolazione. Pochi, però, sono i software sviluppati per analizzare la componente spaziale dei dati genetici, e predisposti per restituire output cartografici. I risultati rappresentati maggiormente in formato tabellare e grafico e più raramente su base geografica, richiedono un certo impegno interpretativo. Inoltre, sulla scia della diffusione della *landscape genetics* applicata principalmente in studi su specie animali e in minor misura di specie vegetali, sta assumendo sempre più importanza l'analisi della natura spaziale dei dati genetici. L'analisi della struttura genetica, spazialmente esplicita, di una specie è quindi necessaria per comprendere l'influenza che le variabili ambientali e paesaggistiche hanno avuto sui flussi genici e sull'adattamento all'ambiente della stessa specie. L'impiego della tecnologia GIS e dei suoi strumenti di analisi ha portato a nuovi risultati e ad un nuovo modo di rappresentare e interpretare i dati genetici.

La sperimentazione dell'*overlay technique* e la produzione di output cartografici sono stati ampiamente trattati in questo caso di studio. Attraverso la combinazione delle analisi geostatistiche, interpolazioni del Q-membership tramite IDW o kriging (clustering surface map), e l'analisi della struttura genetica, secondo un approccio bayesiano, è stato possibile valutare la struttura genetica e la coincidenza tra le discontinuità genetiche e gli elementi del paesaggio. Inoltre è stato sperimentato un nuovo metodo di rappresentazione della struttura e della diversità genetica,

attraverso le clustering surface map, le mappe di sintesi e di diversità genetica. L'*overlay technique* si è rivelata, dunque, un valido strumento di analisi in studi di *landscape genetics*.

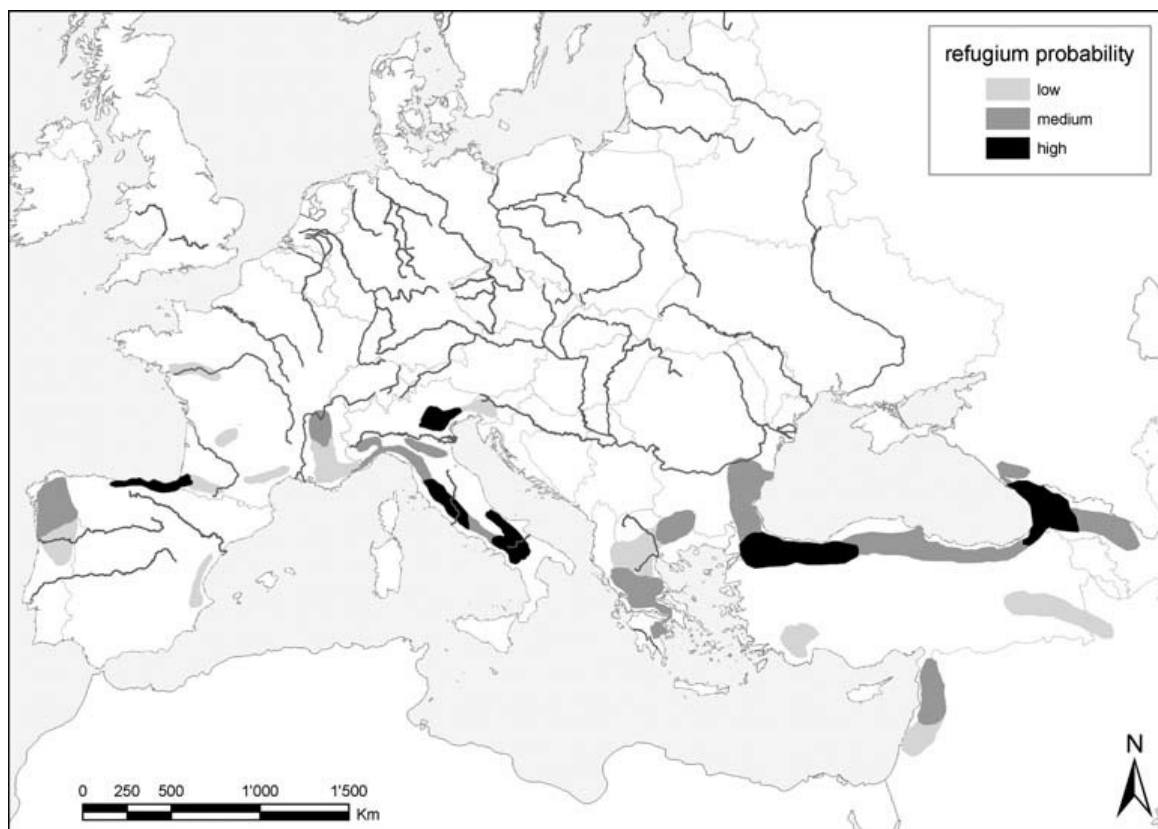


Fig. 9 - Principali aree rifugio quaternarie per il castagno europeo, secondo il grado di probabilità. (Figura tratta da Krebs et al. 2004).

4. Terzo caso di Studio: Analisi spaziali nella linea di ricerca “WA.L.NET - Walnut *Landscape genetics* in Eurasia”

Il progetto WA.L.NET, nato dalla collaborazione scientifica tra il CNR- IBAF, Porano, CNR-Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA), Milano (“Biodiversità ed impieghi innovativi del noce in Uzbekistan” Progetto di grande rilevanza Ministero degli Esteri Italiano Italia-Uzbekistan), l’Università di Oxford (Abingdon, Oxon, UK), e l’USDA-Hardwood Tree Improvement and Regeneration Center (HTIRC) presso la Purdue University (Indiana, USA) (WA.L.NET Agreement) rappresenta la prima valutazione su larga scala delle risorse genetiche di *J. regia* attualmente presenti nell’area di indigenato e mira a fornire preziose informazioni su come le caratteristiche dell’ambiente/paesaggio abbiano influito sul flusso genico e promosso l’adattamento locale di piante di noce.

L’applicazione dell’*overlay thecnique* nell’ambito del progetto WA.L.NET. ha permesso di quantificare in modo esplicito gli effetti della composizione del paesaggio sulla variabilità genetica spaziale delle risorse di noce. Questo caso studio illustra, infatti, come i principi della *landscape genetics* siano stati applicati per perseguire nuovi risultati nell’analisi della struttura genetica di *J. regia* nell’area nativa.

4.1 Introduzione

Juglans regia L. (noce comune, inglese o persiano) è la specie più conosciuta ed economicamente importante del genere *Juglans*, è distribuita e coltivata in tutte le regioni temperate del mondo sia per la produzione di legnane pregiato sia per i frutti eduli. Sebbene non si conosca il centro di origine di *J. regia*, è considerata da sempre nativa delle zone montuose dell’Asia centrale, che si estendono dalla provincia dello Xinjiang della Cina occidentale, l’Uzbekistan e il Kirghizistan sud-occidentale e le montagne del Nepal, Tibet, India del Nord e Pakistan, a ovest attraverso l’Afghanistan, Turkmenistan e Iran fino al Caucaso (Azerbaijan, Armenia, Georgia e Turchia orientale) (Hemery et al. 2005). Dallo Xinjiang o Tibet, dove è ancora presente in entrambe le forme coltivate e selvatiche, *J. regia* è stata probabilmente introdotta in Cina centrale e orientale durante la Dinastia Han circa 2100 anni fa (Wang et al. 2008). Il dibattito è aperto sulla possibilità che il noce persiano si sia estinto in Europa durante le glaciazioni del Pleistocene o che sia sopravvissuto in rifugi situati in Italia, in Spagna e nei Balcani, come suggerito da alcuni studi paleopalinologici (Carrión & Sánchez-Gomez 1992). Tuttavia, è ampiamente condivisa l’opinione che non esista in Europa alcuna popolazione naturale di *J. regia*.

Le oscillazioni climatiche del Pleistocene e l'espansione post-glaciale dai rifugi sono stati riconosciuti come i fattori che hanno maggiormente influenzato il processo di differenziazione delle risorse genetiche europee ed asiatiche di specie forestali (Hewitt 2004). Alcuni studi ipotizzano l'esistenza di rifugi multipli durante l'Ultimo Massimo Glaciale (Last Glacial Maximum, LGM) in Cina, Asia Centrale (Qian & Ricklefs 2000), penisola Iberica, penisola Italiana, Balcani e Caucaso (Hewitt 2004). Alla fine del LGM, il progressivo riscaldamento globale permise ad una parte delle piante arboree sopravvissute di espandersi, altre invece rimasero "intrappolate". Petit et al. (2003) definiscono i pattern di migrazione delle specie forestali degli ultimi 20.000 anni come pattern specie-specifici, legati ai meccanismi di dispersione tramite polline e seme (Isolation By Distance, IBD) ed ai differenti range di tolleranza alle condizioni ambientali. Alcune caratteristiche ambientali (ad es. gradiente di temperatura ed umidità) e del paesaggio (ad es. montagne, fiumi, deserti) avrebbero agito da barriere al flusso genico causando frammentazione dell'habitat e declino dell'effective population size (bottleneck events o founder effect) con conseguente erosione genetica ed incremento della differenziazione tra popolazioni della stessa specie (Gugerli et al. 2009, Qiu et al. 2011). Di conseguenza, per effetto di ripetuti eventi del fondatore durante le espansioni post-glaciali, la ricchezza allelica delle specie forestali sarebbe progressivamente diminuita nelle zone di successiva colonizzazione (Widmer & Lexer 2001). Inoltre, negli ultimi duemila anni, la distribuzione geografica di numerose specie arboree è stata fortemente influenzata dall'azione umana, in particolare nel bacino del Mediterraneo. La frammentazione degli habitat e l'estensivo sfruttamento del germoplasma hanno causato una diminuzione della diversità genetica e del potenziale evolutivo di specie arboree (Grivet et al. 2008, Bagnoli et al. 2009). Questi eventi hanno sicuramente interessato la specie *J. regia* la cui recente storia, visto il suo valore per la produzione di frutti e di legno, è intrecciata con le attività antropiche (domesticazione, agricoltura, deforestazione, urbanizzazione).

Negli ultimi venti anni, nelle regioni temperate del mondo, si è verificato un incremento nella domanda di nuovi genotipi di noce per la produzione di legno e/o frutti e da destinare a programmi per il recupero e il rimboschimento di territori agricoli degradati (Woeste et al. 2011). In questo contesto diversi studi hanno trattato la variabilità genetica delle risorse di noce utilizzando marcatori molecolari, anche se sono stati focalizzati principalmente su risorse genetiche a livello nazionale, per esempio in Cina (Gunn et al. 2010), Spagna (Ruiz-Garcia et al. 2011), Italia (Pollegioni et al. 2011) e Iran (Karimi et al. 2010). Sebbene continui a crescere l'interesse per lo sviluppo di nuove strategie per la conservazione del germoplasma di *J. regia* (Aradhya et al. 2010; Molnar et al. 2011), un'accurata ed esaustiva analisi delle risorse genetiche mondiali di noce (sia selvatiche che coltivate) non è stata ancora portata a termine. La conoscenza dettagliata dell'attuale struttura genetica spaziale è essenziale per la comprensione della storia naturale del noce e per poter

risalire ai possibili centri di diversità genetica, comprendere gli eventi di espansione post-glaciale e far luce sulla sua storia di domesticazione. Inoltre uno studio della struttura genetica spaziale, ad una scala di dettaglio, combinato all'analisi dei dati geografici ed ecologici potrebbe fornire preziose informazioni su come le variabili ambientali e paesaggistiche abbiano influenzato il flusso genico e promosso adattamenti locali di popolazioni di noce in Eurasia. Tali conoscenze potrebbero inoltre consentire di prevedere la futura evoluzione della specie *J. regia* in risposta ai cambiamenti climatici in atto (Clark & Hemery 2009), e contribuire alla definizione di nuove strategie per la conservazione e per il recupero del germoplasma di *J. regia*.

Recentemente, molti studi hanno dimostrato la grande potenzialità dell'approccio di studio *landscape genetics* nel comprendere i processi evolutivi di specie arboree in ambienti complessi. La combinazione dei tool molecolari con i Sistemi Informativi Geografici (GIS) consente di condurre l'analisi dei pattern di diversità genetica neutrali o funzionali nelle piante.

In questo studio i tradizionali metodi della genetica di popolazione sono stati integrati con analisi statistiche e le più appropriate tecniche di analisi spaziale, seguendo gli innovativi principi della *landscape genetics*.

Gli obiettivi principali del progetto WA.L.NET sono: (1) la valutazione della diversità genetica e della struttura genetica spaziale di 39 popolazioni di *J. regia* collezionate nell'area nativa, dove la specie cresce spontaneamente, utilizzando 14 marcatori neutrali microsatelliti nucleari, e (2) l'applicazione dell'*overlay technique* per quantificare gli effetti della composizione paesaggistica (espansione post glaciale, barriere fisiche e ambientali), sul flusso genico e sulla variabilità genetica spaziale delle risorse di noce. Il raggiungimento del secondo obiettivo costituisce lo scopo di questo caso di studio.

4.2 Materiali e metodi

In questo studio sono state considerate due tipologie di dati, diversi per natura e provenienza: dati territoriali (immagini satellitari, aeree, modelli digitali del terreno, rilievi gps, dati climatici, ambientali ecc.), che costituiscono la componente spaziale del database e dati genetici multilocus, (componente alfanumerica).

Sono state prese in considerazione 39 popolazioni asiatiche di *Juglans regia* (fig. 1), i dati spaziali e i relativi dati attributo, derivanti dalle analisi genetiche, sono stati organizzati in un geo-database utilizzando il software ArcGIS 9.3, conoscendo per ogni popolazione le rispettive coordinate geografiche. In figura 1 sono riportate le popolazioni in esame, sulla base del modello digitale del terreno, e le fitoregioni proposte da Djamali et al. (2012) e Qiu et al. (2011).

Collezione di *J. regia*

Nell'ambito dell'accordo scientifico WA.L.NET è stata creata un'ampia e unica collezione di materiale vegetale proveniente da alberi di *Juglans regia*, che comprende 39 popolazioni asiatiche di noce (fig. 1) campionate in Cina (6), Kirghizstan (9), Uzbekistan (17), Tadjikistan (1), Pakistan (2), Iran (1), Turchia (1) e Georgia (2) (Tabella 1). Queste popolazioni di noce ricadono in sette regioni fitogeografiche, proposte da Djamali et al. (2012) e Qiu et al (2011) (fig. 1, tabella 1). In particolare le nove popolazioni del Kirghizstan e sette delle 17 popolazioni uzbeke sono state campionate nelle foreste naturali di noce da frutto dei monti del Tien Shan occidentale. Queste foreste rappresentano la più grande area naturale di boschi di noce nel mondo (Hemery et al. 2005).

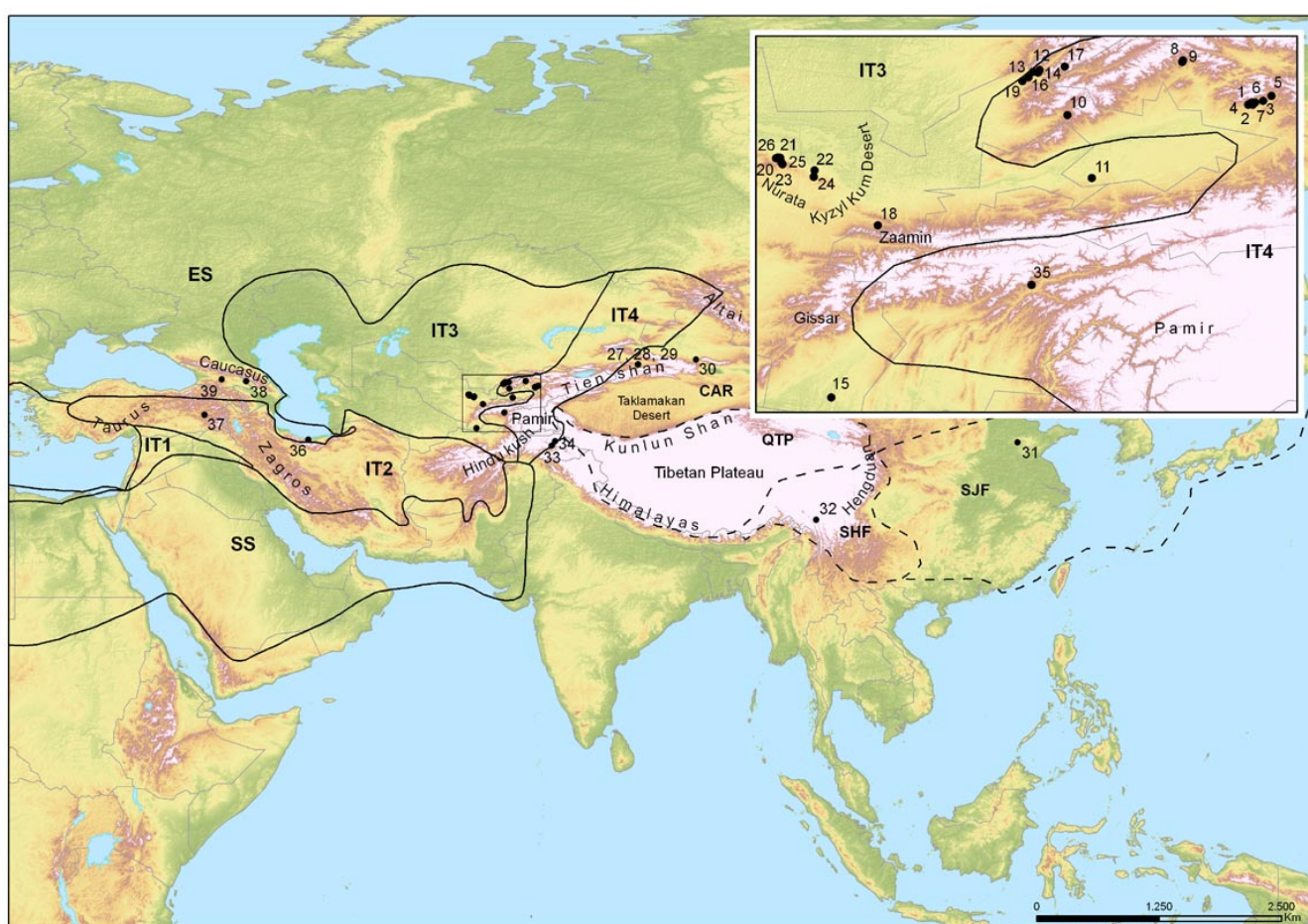


Fig. 1 – Localizzazione delle 39 popolazioni (•) di *Juglans regia* collezionate nel range nativo: Kirgizstan (1-9 Monti del Tien Shan occidentale), Uzbekistan (10, 12-14, 16-17, 19 Monti del Tien Shan occidentale; 11 Valle di Fergana; 15 Monti Gissar occidentale; 18 Monti Zaamin; 20-26 Nurata), Cina (27-29 Monti del Tien Shan orientale; 30 capitale provincia dello Xinjiang; 31 provincia dello Shandong; 32 Tibet- Himalaya orientale), Pakistan (33-34 Kashmir-Hilamaya occidentale), Tajikistan (35 Montagne del Pamir), Iran (36 margini della catena dell'Alborz), Turkey (37 Anatolia) and Georgia (38-39 Caucaso). Suddivisione fitogeografica dell'Asia sud occidentale e centrale (Djamali et al. (2012) linea nera continua e Qiu et al (2011) linea nera tratteggiata): Saharo-Sindian (SS), Euro-Siberiana (ES), Irano-Turaniana (IT1, IT2, IT3, IT4), Asiatica Centrale (CAR), Palteau Qinghai-Tibetano (QTP), Foresta Sino-Himalayana (SHF) and Foresta Sino-Giapponese (SJF).

Tabella 1. Numero identificativo dei campioni (N), coordinate geografiche (Lat, Long) e altitudine slm (Alt.) per 39 popolazioni di J. regia, localizzate in sette distinte regioni fitogeografiche (RF) nel range nativo.

Nazione	Provincia	ID	Popolazione	Lat.	Long.	Alt.(m)	N	RF
Kyrgyzstan	Jalal-Abad	1	Ak-Terek ¹	40°27'00"N	72°45'00"E	1700	45	IT4
		2	Sharap ¹	41°16'12"N	72°50'59"E	1620	18	IT4
		3	Yaradar ¹	41°15'00"N	73°00'00"E	1260	16	IT4
		4	Shaidan ¹	41°04'48"N	72°42'00"E	1590	24	IT4
		5	Kyzyl-Ungur ¹	41°24'00"N	73°00'00"E	1400	45	IT4
		6	Katar-Yangak ¹	41°15'00"N	72°45'00"E	1900	19	IT4
		7	Kyok-Sarau ¹	41°17'59"N	72°52'47"E	1830	25	IT4
		8	Kyr-sai ²	41°50'24"N	71°57'00"E	1320	27	IT4
		9	Ters-Kolt ²	41°49'12"N	71°56'23"E	1440	24	IT4
Uzbekistan	Namangan	10	Kamchik	41°04'60"N	70°31'00"E	1431	18	IT4
		11	Yakkatut	40°26'21"N	70°53'14"E	389	18	IT3
		12	Sidjak	41°41'27"N	70°03'28"E	845	10	IT4
	Tashkent	13	Charvak	41°64'00"N	70°03'00"E	1350	18	IT4
		14	Nanai	41°43'00"N	70°05'60"E	1338	18	IT4
		16	Bogustan	41°40'60"N	70°04'60"E	1314	20	IT4
		17	Bostanlyk ³	41°34'18"N	69°45'51"E	455	18	IT4
		19	Karankul	41°34'26"N	69°52'55"E	1680	36	IT4
		15	Djarkurgan	37°30'00"N	67°25'00"E	480	16	IT3
		18	Bakhmal ⁴	39°43'00"N	68°01'00"E	1229	15	IT3
		20	Farish	40°34'60"N	66°52'00"E	486	19	IT3
		21	Andigen	40°35'14"N	66°45'29"E	662	12	IT3
		22	Katta-Bogdan	40°25'29"N	67°12'13"E	920	38	IT3
		23	Khayat	40°31'38"N	66°46'24"E	968	16	IT3
		24	Yamchi	40°20'23"N	67°11'32"E	906	10	IT3
		25	Karri	40°30'05"N	66°47'27"E	1043	20	IT3
		26	Madjerum ⁵	40°35'00"N	66°42'30"E	728	28	IT3
Cina	Xinjiang	27	Gongliu-1 ⁶	43°22'15"N	82°16'03"E	650	34	CAR
		28	Gongliu-2 ⁶	43°20'46"N	82°16'57"E	600	67	CAR
		29	Gongliu-3 ⁶	43°20'24"N	82°15'32"E	569	27	CAR
		30	Urumqi	43°48'00"N	87°35'00"E	850	29	CAR
		31	Sunbè	36°12'00"N	117°05'00"E	167	19	SJF
		32	Dashuicun	29°25'00"N	90°58'00"E	3650	48	SHF
Pakistan	Gilgit-Baltistan	33	Gilgit Valley	35°55'00"N	74°20'02"E	1493	21	CAR-IT4
		34	Hunza Valley	36°19'00"N	74°39'00"E	2500	25	CAR-IT4
Tadjikistan	Karotegin	35	Shouli	38°57'00"N	70°00'00"E	1882	16	IT4
Iran	Alborz	36	Karaj	36°28'00"N	52°00'00"E	1401	12	IT2
Turchia		37	Anatolia	38°42'00"N	42°27'00"E	1650	19	IT2
Georgia	Kakheti	38	Lagodekh ⁷	41°49'00"N	46°17'00"E	1500	15	ES
	Shida Kartli	39	Skra	41°59'28"N	44°00'49"E	1182	21	ES
Totale		-	-	-	-	-	926	

¹ Fergana Range. ² Riserva della Biosfera Sary-Chalek. ³ Parco Nazionale Ugam-Chatkal. ⁴ Parco Nazionale Zaamin. ⁵ Riserva Naturale Nurata. ⁶ Riserva Naturale Gongliu Wild Walnut. ⁷ Riserva Naturale Lagodekhi.

⁸ Regioni fitogeografiche: Irano-Turaniana (IT2, IT3, IT4), Asiatica Centrale (CAR), Foresta Sino-Himalayana (SHF), Foresta Sino-giapponese (SJF) e Euro-Siberiana (ES).

Dati relativi a polline fossile

Gli studi sui pollini fossili sono spesso utilizzati per ricostruire le variazioni della distribuzione delle specie forestali e per identificare i rifugi glaciali (Krebs et al. 2004; Connor & Kvavdze 2008). Pertanto è stata condotta un'accurata ricerca bibliografica sia su riviste scientifiche pubblicate fino a Dicembre 2012, che su web-database di datazioni con radiocarbonio di polline fossile (World Data Center for Paleoclimatology WDC (2005) and European Pollen Database EPD (2003)), che ha consentito di collezionare 76 siti geografici di polline fossile del tipo *Juglans* nell'area di studio. I siti (allegato 1), di cui sono note le coordinate geografiche sono stati collezionati in ArcGIS 9.3. e sono stati classificati in base alla loro localizzazione rispetto al range nativo di *J. regia* L e di *J. cathayensis* e *J. mandshurica* maxim. I dati dei pollini fossili sono stati inoltre distinti in base all'età, datata con il radiocarbonio, in otto periodi: 400-2000 anni fa, Età del Ferro (2000-3200 anni fa), Età del Bronzo (3200-5000 anni fa), Età del Rame (5000-8000 anni fa), Neolitico-A (8000-10000 anni fa), Mesolitico (10000-12000 anni fa), Paleolitico superiore (12.000-40.000 anni fa) e ≥ 40000 anni fa. Una limitazione nel ricostruire la storia del noce persiano è data dall'impossibilità di distinguere tra il polline fossile di *J. regia*, *J. cathayensis* e *J. mandshurica* nella Cina orientale, dove l'attuale distribuzione geografica di queste specie si sovrappone.

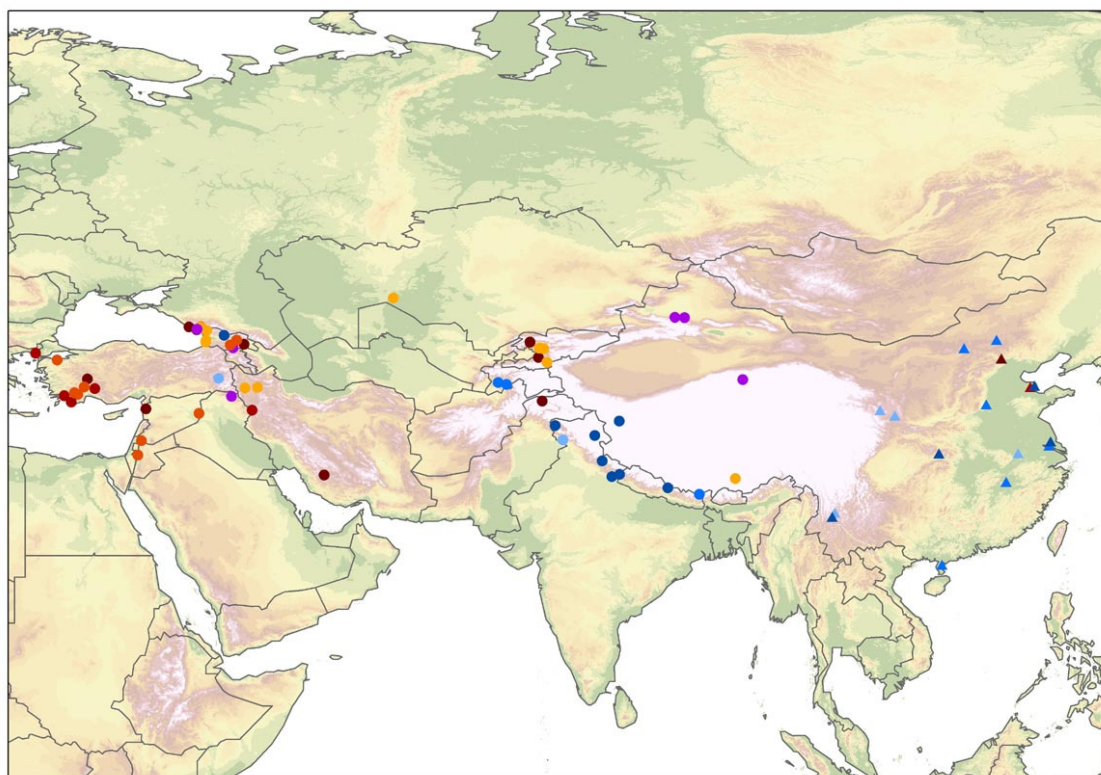


Fig. 2 - 76 prime tracce di polline fossile del tipo *Juglans*, datate con radiocarbonio in Asia, Vicino e Medio Oriente. Sono stati considerati otto periodi di riferimento: ● 400-2000 yr BP, ● Età del Ferro (2000-3200 yr BP), ● Età del Bronzo (3200-5000 yr BP), ● Età del Rame (5000-8000 yr BP), ● Neolitico-A (8000-10000 yr BP), ● Mesolitico (10000-12000 yr BP), ● Paleolitico Superiore (12000-40000 yr BP) and ● ≥ 40000 yr BP. I siti sono localizzati nel range nativo di *J. regia* L e *J. cathayensis* e *J. mandshurica* Maxim, indicati rispettivamente con cerchietti e triangolini.

Dati cartografici di base

I dati cartografici di base sono stati acquisiti da geospatial data center disponibili sul web. È stato acquisito il modello digitale del terreno GTOPO30, alla risoluzione spaziale di 30 secondi di arco, disponibile al seguente indirizzo internet http://eros.usgs.gov/#/FindData/Products_and_Data_Available/GTOPO30. GTOPO30 è un modello digitale di elevazione (dem), relativo all'intero globo terrestre, rappresenta la distribuzione delle quote di un territorio ad una distanza regolare di 30 secondi di arco (circa 1 Km). È stato reso disponibile dal data center EROS (Earth Resources Observation and Science) nel 1993. Il sistema di riferimento geografico è WGS84 e la latitudine e la longitudine sono espresse in gradi decimali. I dati sono suddivisi in 33 settori acquisibili separatamente. Per coprire l'area di studio sono stati acquisiti i dati relativi a 6 settori, che coprono un'area geografica compresa tra 20° Est e 140° Est in longitudine e tra 0° e 90° Nord in latitudine. I dati sono forniti in formato raster (.DEM) a 16 bit, con celle che misurano 0.0083333x0.0083333 gradi (30 secondi di arco).

I confini amministrativi (limiti di stato, di regione, province ecc.) dei paesi interessati dallo studio, sono forniti da ESRI in formato shapefile (.shp e .lyr).

Dati climatici

I dati climatici sono stati tratti dal WorldClim Data Center (<http://www.worldclim.org>; Hijmans et al. 2005), che dispone di quattro variabili climatiche mensili e 18 variabili bioclimatiche per l'intero globo, eccetto l'Antartide, per l'arco temporale che va dal 1950 al 2000. I layer sono forniti in formato ESRI grid (a diverse risoluzioni spaziali da 30 secondi di arco a 2.5, 5 e 10 minuti di arco), espressi in latitudine e longitudine, e il Datum di riferimento è WGS84.

Sono state acquisite le seguenti variabili climatiche mensili, alla risoluzione di 2.5 minuti di arco: valori medi delle temperature minime (*tmin*), medie (*tmean*) e massime mensili (*tmax*) espresse in °Cx10, e valori medi delle precipitazioni mensili (*prec*) espressi in mm per l'area in esame.

Inoltre per l'area in esame sono state rappresentate sette regioni fitogeografiche, proposte da Djamali et al. (2012) e Qiu et al (2011) (Fig. 1, tabella 1). I limiti tra le sette regioni fitogeografiche sono stati digitalizzati seguendo le mappe di Djamali et al. (2012) e Qiu et al (2011), mediante il software ArcGIS 9.3.

Analisi landscape genetics

L'*overlay technique* descritta da Holderegger et al. (2010) è stata seguita per individuare le coincidenze geografiche tra discontinuità o barriere genetiche con elementi del paesaggio. Questo approccio analitico prevede di:

1. identificare i principali cluster di popolazioni;

2. identificare le barriere e le discontinuità genetiche;
3. interpolare variabili genetiche per costruire isolinee genetiche.

Le strutture genetiche così identificate sono successivamente sovrapposte ai dati topografici/morfologici (per es. dem) o alle mappe di copertura/uso del suolo per individuare le coincidenze geografiche tra le barriere, discontinuità, o isolinee genetiche, con gli elementi del paesaggio.

Le popolazioni campionate nell'areale di distribuzione della specie in esame sono state analizzate mediante marcatori molecolari (14 microsatelliti nucleari SSR) che individuano le differenze a livello di zone ripetute del genoma.

Il software GenAEx 6.3 (Peakall & Smouse 2005) è stato impiegato per calcolare i principali indici di diversità genetica: numero medio di alleli per locus (A), eterozigosità osservata (H_o), eterozigosità attesa (H_E), eterozigosità attesa pesata sul numero di campioni (UH_E) e numero di alleli privati per singola popolazione. La ricchezza allelica (R_s) e la ricchezza degli alleli privati (PR), che possono essere influenzate dalle dimensioni del campione (El Mousadik & Petit 1996), sono state calcolate con il metodo di rarefazione con il software HP-rare (Kalinowski 2004). Tale metodo stima il numero previsto di alleli e/o alleli privati in un sotto-campione di n individui scelti a caso da un campione di N individui in ogni popolazione. In questo studio, le stime di R_s e PR sono stati standardizzati su campione minimo di dodici individui.

I parametri di diversità genetica R_s e UH_E , espressi in formato tabellare, sono stati importati, in un geodatabase creato in ambiente ArcGIS 9.3, relativo alle popolazioni di *J. regia*. Le popolazioni di noce, note le coordinate geografiche, sono state salvate nel geodatabase come feature class di punti. Semplici funzioni di *Join* e *Relate table* consentono di relazionare o associare i dati attributo alle feature class. In questo modo qualsiasi funzione di analisi spaziale può essere applicata ai dati attributo relativi ad una data feature class.

Per elaborare le mappe della diversità genetica è stata utilizzata l'estensione Geostatistical Analyst, disponibile in ArcGIS 9.3. Sono state investigate le proprietà statistiche del dataset e testate le funzioni di interpolazione Kriging e Inverse Distance Weighted. Applicando le due tecniche di interpolazione al dataset dei valori di diversità genetica delle popolazioni di *J. regia*, è stato stimato un errore, inteso come Root Mean Square Prediction Error, più basso per l'IDW. Sulla base del minimo errore di predizione, i parametri di diversità genetica sono stati interpolati tramite la funzione IDW.

La struttura genetica delle popolazioni di noce è stata ricostruita utilizzando STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000), che segue un approccio Bayesiano combinato con il metodo di simulazione Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Questo metodo individua il numero più probabile di clusters presenti con contemporanea assegnazione degli individui ai medesimi minimizzando il linkage

disequilibrio e la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. L'analisi utilizza il modello di mescolanza (admixture model) sull'intero set di dati senza fornire informazioni a priori sulle popolazioni e presupponendo correlazione tra le frequenze alleliche. Questa analisi fornisce il numero più probabile di K cluster e il corrispondente coefficiente di "membership" (Q-value), ossia la frazione di genoma che ogni individuo ha ereditato dai vari clusters per popolazione e per individuo. In genere viene testato un range di possibili cluster (K) compreso tra 1 e il numero di popolazioni in esame e si ripete una serie di sei corse indipendenti per ogni possibile K con un periodo di burn-in di 10000 steps seguiti da 10^5 ripetizioni MCMC. Successivamente si applica la statistica ad-hoc ΔK sviluppata da Evanno et al. (2005) che fornisce il numero più probabile di cluster dedotti mediante approccio Bayesiano. Questo valore si basa sul tasso di variazione di secondo ordine di $L(K)$ (la probabilità a posteriori dei dati rispetto ad un dato K) tra due valori di K successivi per sei repliche. Come dimostrato da Evanno et al. (2005), è possibile identificare in questo modo il più alto livello gerarchico della separazione genetica tra popolazioni. Successivamente è possibile elaborare separatamente i gruppi dedotti da una prima analisi di STRUCTURE, al fine di individuare possibili sottostrutture. L'algoritmo FullSearch integrato nel software CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) permette di mediare le sei corse per il numero più probabile di cluster; infine, mediante il software DISTRUCT (Rosenberg 2004) è possibile visualizzare graficamente la corrispondente matrice dei valori di Q.

Il coefficiente di membership Q-value per popolazione, fornito da STRUCTURE 2.3.3 per il numero di K cluster più probabile, è stato interpolato utilizzando la funzione Inverse Distance Weighted (IDW), che ha mostrato un più basso valore di RMSPE rispetto al kriging. Questo metodo consente di elaborare le K clustering surface maps, ossia le superfici di probabile appartenenza delle popolazioni ai K cluster dedotti per l'areale di distribuzione delle specie in esame.

Il software BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), basato sull'algoritmo *maximum difference* di Monmonier, è stato utilizzato per individuare le probabili barriere genetiche. Le linee di discontinuità genetica sono elaborate dal programma sulla base della triangolazione di Delauney (network di connessione tra le coordinate geografiche delle popolazioni) e la risultante tessellazione di Voronoï. Ad ogni spigolo dei poligoni di Voronoï viene associato il valore della corrispettiva distanza genetica di Nei (D_A) tra coppie di popolazioni, calcolata con la funzione GENDIST del software PHYLIP (Felsenstein 2005). La procedura inizia a tracciare un *boundary* lungo lo spigolo al quale è associato il valore più elevato di D_A tra due popolazioni, poi lo estende al successivo spigolo al quale è associato il secondo valore D_A più elevato. Questo processo si ripete finché il *boundary* in costruzione non raggiunge un'altro *boundary* o il limite esterno della *network*. La procedura individua in progressione gerarchica molteplici barriere genetiche. La significatività di

queste è testata mediante 100 matrici della distanza di Nei ricampionate, calcolate usando i software SEQBOOT, GENDIST e PHYLIP.

Sulla base della poligonazione di Voronoï, sono state digitalizzate le barriere genetiche calcolate dal software BARRIER, secondo il livello gerarchico di derivazione. Le discontinuità genetiche, così ricostruite, sono state sovrapposte al modello digitale del terreno (GTOPO30), per valutare le coincidenze spaziali tra queste strutture genetiche e gli elementi del paesaggio.

Correlazione tra dati genetici e dati paesaggistici

La correlazione tra dati geografici e la diversità genetica del noce persiano è stata esaminata tramite una semplice regressione lineare, seguita dalla correzione di Bonferroni (XLSTAT2010 <http://www.xlstat.com>), tra la ricchezza allelica (R_s) e l'eterozigosità attesa pesata sul numero di campioni (U_{HE}) rispetto alle variabili geografiche (longitudine, latitudine, altitudine) e a 12 variabili bioclimatiche. Queste ultime sono state calcolate utilizzando alcune funzioni di analisi spaziale. Per ognuna delle quattro variabili climatiche mensili, t_{min} (valori medi delle temperature minime mensili), t_{mean} (valori medi delle temperature medie mensili), t_{max} (valori medi delle temperature massime mensili) e $prec$ (valori medi delle precipitazioni mensili) sono stati acquisiti 12 file (per ogni mese) in formato ESRI grid, per un totale di 48 file grid. La funzione di analisi spaziale *Extract Value to Point*, disponibile nel modulo Spatial Analyst, ha permesso di estrarre per ciascuno dei 48 grid i valori delle rispettive variabili per ogni sito di campionamento delle popolazioni. I valori estratti sono stati raccolti in formato tabellare, e sono stati utilizzati per calcolare 12 parametri bioclimatici, già utilizzati da Djamali et al. (2012) per definire otto regioni fitogeografiche dell'Asia centrale e occidentale: la temperatura media annua (T), temperatura media del mese più freddo (T_{min}), temperatura media del mese più caldo (T_{max}), media delle temperature massime del mese più caldo (M), media delle temperature minime del mese più freddo (m), precipitazioni medie annue, valori di precipitazione medi per i tre mesi del quarto di anno invernale (P_{win}), valori di precipitazione medi per i tre mesi del quarto di anno primaverile (P_{spr}), valori di precipitazione medi per i tre mesi del quarto di anno estivo (P_{sum}), valori di precipitazione medi per i tre mesi del quarto di anno autunnale (P_{aut}), indice di continentalità semplice (I_c) e indice xerotermico (X_i).

Inoltre, è stata indagata l'influenza di alcune variabili geografiche sulla divergenza tra le popolazioni di noce nell'area di origine. Per quantificare l'effetto delle distanze geografiche (longitudine, latitudine), delle differenze di altitudine, della presenza di catene montuose o deserti, sul flusso genico tra le popolazioni di noce è stato preso in considerazione l'indice F_{ST} , utilizzando il Mantel test e il partial Mantel test (Mantel 1967, Smouse et al. 1986, Bonnet et al. 2002). In particolare, per stimare l'effetto Isolation By Distance (IBD), è stata testata la correlazione tra

distanze genetiche e geografiche. Assumendo una distribuzione non lineare dei siti di campionamento, è stata condotta un'analisi di regressione tra i valori linearizzati di $[F_{ST}/(1 - F_{ST})]$, stimati per tutte le coppie di popolazioni con il software Arlequin (Excoffier et al. 2005), verso il logaritmo naturale delle distanze geografiche (calcolate come distanze in linea retta in km). Inoltre, in ArcGis 9.3 è stata creata un network di connessione per confrontare tutte le coppie di popolazioni ed è stato sovrapposto al modello globale di elevazione GTOPO30 e alla mappa di vulnerabilità globale alla desertificazione (USDA - Natural Resources Conservation Service, <http://soils.usda.gov/usare/worldsoils/MapIndex/desert.html>). Due siti sono stati considerati separati da una barriera geografica qualora la linea retta di connessione avesse intersecato uno o più regioni montuose, con elevazione ≥ 2000 metri, e / o deserti. Su questa base è stata creata una matrice (Balkenhol et al. 2009) in cui la presenza o l'assenza di barriere è stata indicata con 2 (catene montuose e deserti), 1 (catene montuose o deserti) e 0, rispettivamente. Tuttavia, è importante sottolineare che la probabilità di trovare elementi del paesaggio che possano agire come barriere geografiche tra popolazioni molto distanti geograficamente è più alta, rispetto a popolazioni vicine. Questa assunzione può, però, portare a correlazioni spurie. Pertanto, è stato utilizzato il partial Mantel test per calcolare la correlazione parziale tra F_{ST} linearizzato e la presenza di catena montuosa/deserto. Questa analisi consente di valutare quanto la presenza delle barriere geografiche considerate possa avere influenzato la differenziazione genetica delle popolazioni di noce controllando l'effetto IBD. Infine è stata indagata la corrispondenza tra la struttura genetica delle 39 popolazioni di noce e la loro ripartizione nelle sette regioni fitogeografiche. La procedura non parametrica BioEnv (Clarke & Ainsworth 1993) è stata utilizzata per esplorare la possibile correlazione tra le 12 variabili bioclimatiche con l'indice di differenziazione genetica F_{ST} calcolato tra tutte le coppie di popolazioni.

4.3 Risultati

Una ricerca esaustiva di tracce di polline fossile di noce non è mai stata realizzata. Molte delle sequenze di polline sono concentrate nell'Anatolia occidentale, nei Balcani e nell'Asia sud-orientale; non sono state rinvenute sequenze in aree molto estese, corrispondenti per lo più ad aree aride e molto aride dell'Asia centrale e sud-occidentale. In questo studio sono stati considerati e analizzati 76 siti geografici in Asia e nel Medio e Vicino Oriente (allegato 1), inclusa la Cina orientale, dove gli areali di distribuzione di *J. regia* e di *J. cathayensis* Dode e *J. mandshurica* Maxim, attualmente sono sovrapposti. La figura 2 rappresenta la localizzazione delle prime tracce di polline fossile di *Juglans*, datate con radiocarbonio e provenienti dall'Asia e dal Medio e Vicino Oriente, rinvenute in sequenze di depositi lacustri o sequenze stratigrafiche, e fornisce indicazioni

preliminari sulla possibile localizzazione geografica di rifugi glaciali per il noce e sull'identificazione dei suoi probabili centri di origine. Le prime tracce di noce persiano datate Pleistocene superiore (Paleolitico superiore 12000-40000 anni fa) e inizio dell'Olocene (Mesolitico 10000-12000 anni fa) si trovano nella catena Himalayana del Nepal, nell'India nord-occidentale, nelle montagne Kunlun occidentali del Plateau Tibetano e nelle montagne del Pamir del Tajikistan meridionale. Recenti studi indicano che il polline di noce si ritrova costantemente in sequenze stratigrafiche oligo-plioceniche delle montagne del Tien Shan orientale, con un picco di abbondanza nell'optimum climatico del Miocene medio (18-15 Ma di anni fa). Altre tracce indicano la presenza di polline fossile di *Juglans* nel Plateau Tibetano nord-orientale da 3.1 to 2.6 Ma di anni fa. Invece nelle foreste di noce del Kirgizstan, montagne del Tien Shan occidentale, le prime tracce di polline fossile risalgono all'età del Rame (~ 7500 anni fa) e divengono predominanti solo nell'età del Ferro circa 2000 anni fa. È importante sottolineare che questi ultimi record coprono solo gli ultimi 8000 anni. Infine, nel Medio e Vicino Oriente, la zona di rifugio più considerevole per le specie di noce potrebbe essere la regione Transcaucasica. La figura mostra che numerose tracce di polline di noce sono state trovate nel Caucaso dall'inizio dell'Età del Rame (5000-8000 anni fa) e/o del Bronzo (3200-5000 anni fa). In pochi ma importanti siti si ritrovano testimonianze di polline di *Juglans* durante il Pleistocene medio nella Russia meridionale, il Paleolitico superiore in Georgia e nell'Iraq nord-occidentale.

La variabilità della diversità genetica tra le popolazioni in esame è rappresentata (fig. 3) in funzione dei parametri R_s e UH_E , interpolati tramite la funzione IDW. Due aree geografiche mostrano valori di R_s e UH_E elevati: la prima area nell'Asia centro-meridionale, include otto siti localizzati in Tibet (Dashuicun), Kashmir- Himalaya occidentale (Hunza e Gilgit, Pakistan), Pamir settentrionale (Shouli, Tajikistan), montagne Zaamir (Djarkurgan, Uzbekistan), montagne Gissar (Bakhmal, Uzbekistan) e Tien Shan occidentale (Karankul e Bostanlyk, Uzbekistan); la seconda area corrisponde a tre siti transcaucasici, Anatolia (Turchia), Lagodekhi e Skra (Georgia). Inoltre tre siti nel Tien Shan orientale sono caratterizzati da valori di diversità genetica relativamente elevati. Non esiste una significativa correlazione tra la diversità genetica, espressa come R_s e UH_E , e le variabili geografiche (longitudine, latitudine, altitudine) e le 12 variabili bioclimatiche.

Dall'analisi condotta con STRUCTURE e dalla statistica di Evanno et al. (2005) risulta che il numero più probabile di cluster è $K = 2$ ($\Delta K = 750.68$), ossia le popolazioni esaminate si separano con maggiore probabilità in due gruppi distinti, seguito da $K = 3$ ($\Delta K = 86.17$) e da $K = 4$ ($\Delta K = 18.29$). Considerando la suddivisione delle popolazioni di noce in 4 cluster come la più interessante e rappresentativa, si è scelto di raffigurare le superficie ottenute interpolando il coefficiente di membership Q-value per popolazione, fornito da STRUCTURE per $K = 4$, mediante la funzione IDW.

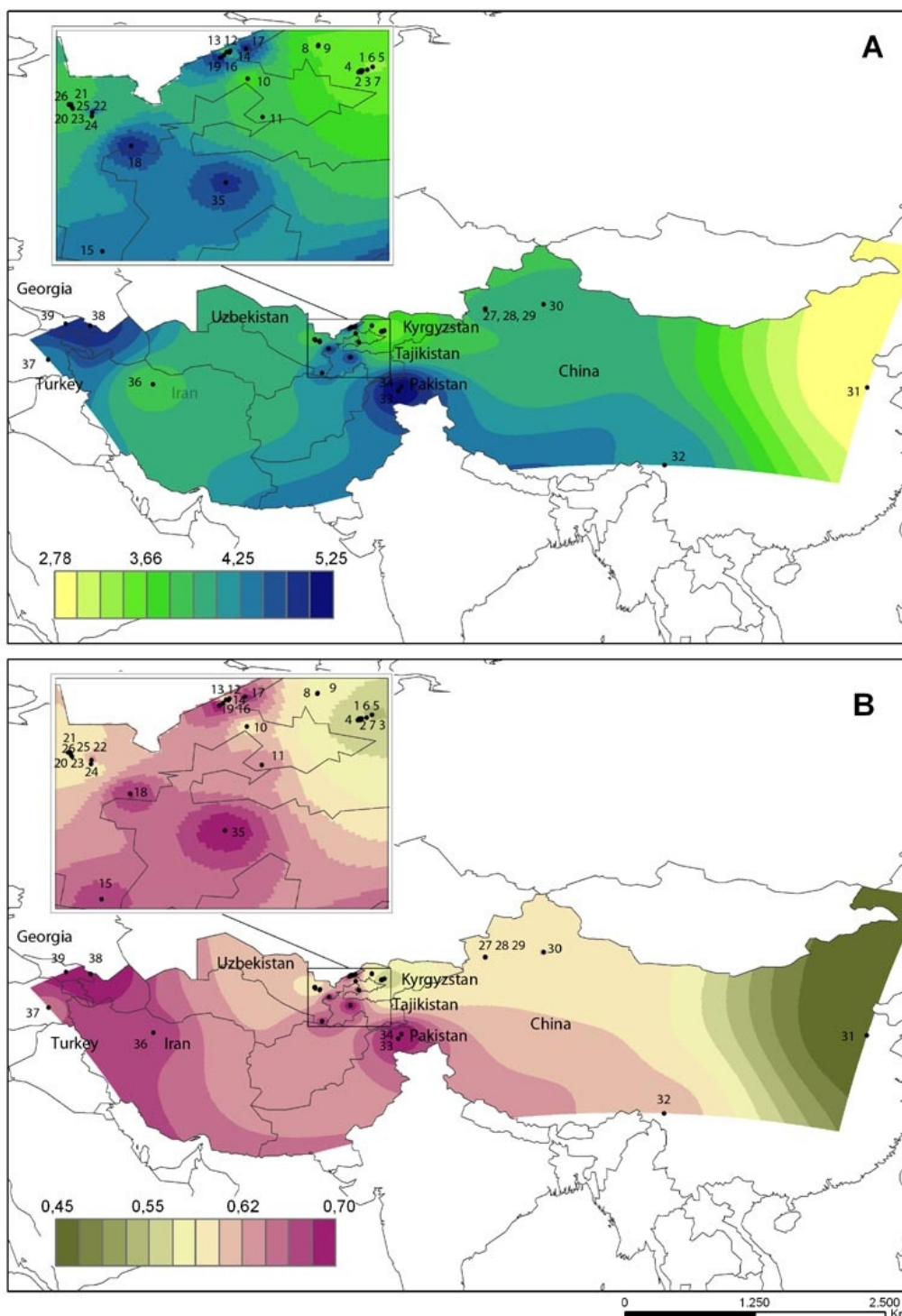


Fig. 3 – Diversità genetica, calcolata tramite interpolazione dei valori di ricchezza allelica (R_s) (**A**) e dell'eterozigosità attesa (U_{H_E}) (**B**) per le 39 popolazioni di *J. regia* nel range nativo.

Con questo metodo sono state prodotte le k clustering surface map, ossia le mappe di probabile appartenenza delle popolazioni ai 4 cluster per l'areale in esame (fig. 4) e confrontate con i profili genetici multilocus elaborati con STRUCTURE (fig. 5). In questa rappresentazione il colore marrone scuro indica una maggiore similarità genetica tra le popolazioni che diminuisce passando alle gradazioni del giallo. La prima clustering surface map, corrispondente al cluster 1, mostra che il primo pool genico è centrato nelle montagne del Tien Shan occidentale dell'Asia centrale ($Q_1 \geq$

0.8956). Questo cluster comprende 243 alberi di noce collezionati in nove siti geografici del Kyrgyzstan, ricadenti nella regione fitogeografica Irano-turaniana IT4. Il cluster 2 ($Q_2 \geq 0.8001$) predomina invece in Asia occidentale (fitoregioni Irano-turanaiana IT2 e Eurosiberiana), e centro-meridionale (IT4, Asiatica Centrale CAR-IT4, Foresta Sino-Himalayana) e include individui provenienti da Georgia, Turchia, Iran, Tajikistan, Pakistan e Tibet. Inoltre, 32 alberi di noce (89%) collezionati a Karankul (IT4, Uzbekistan) e 10 su 67 (14.93%) provenienti da Gongliu 2 (CAR, provincia dello Xinjiang, Cina) sono assegnati senza ambiguità al cluster 2 (fig. 4 e fig. 5C). Gli individui provenienti da Nurata (fitoregione Irano-turaniana IT3) nell'Uzbekistan centro-orientale costituiscono il cluster 3, mentre quelli provenienti dalla Cina orientale e settentrionale (fitoregione Asiatica Centrale CAR e Foresta Sino-giapponese SJF) il cluster 4. Inoltre l'analisi di STRUCTURE rivela che le rimanenti nove popolazioni dell'Uzbekistan orientale (IT4 e IT3) presentano admixture tra il cluster 1 e il cluster 3 (fig. 4 e fig. 5C). La popolazione di Farish (pop20 in fig. 4) proveniente da Nurata mostra un admixture complessa.

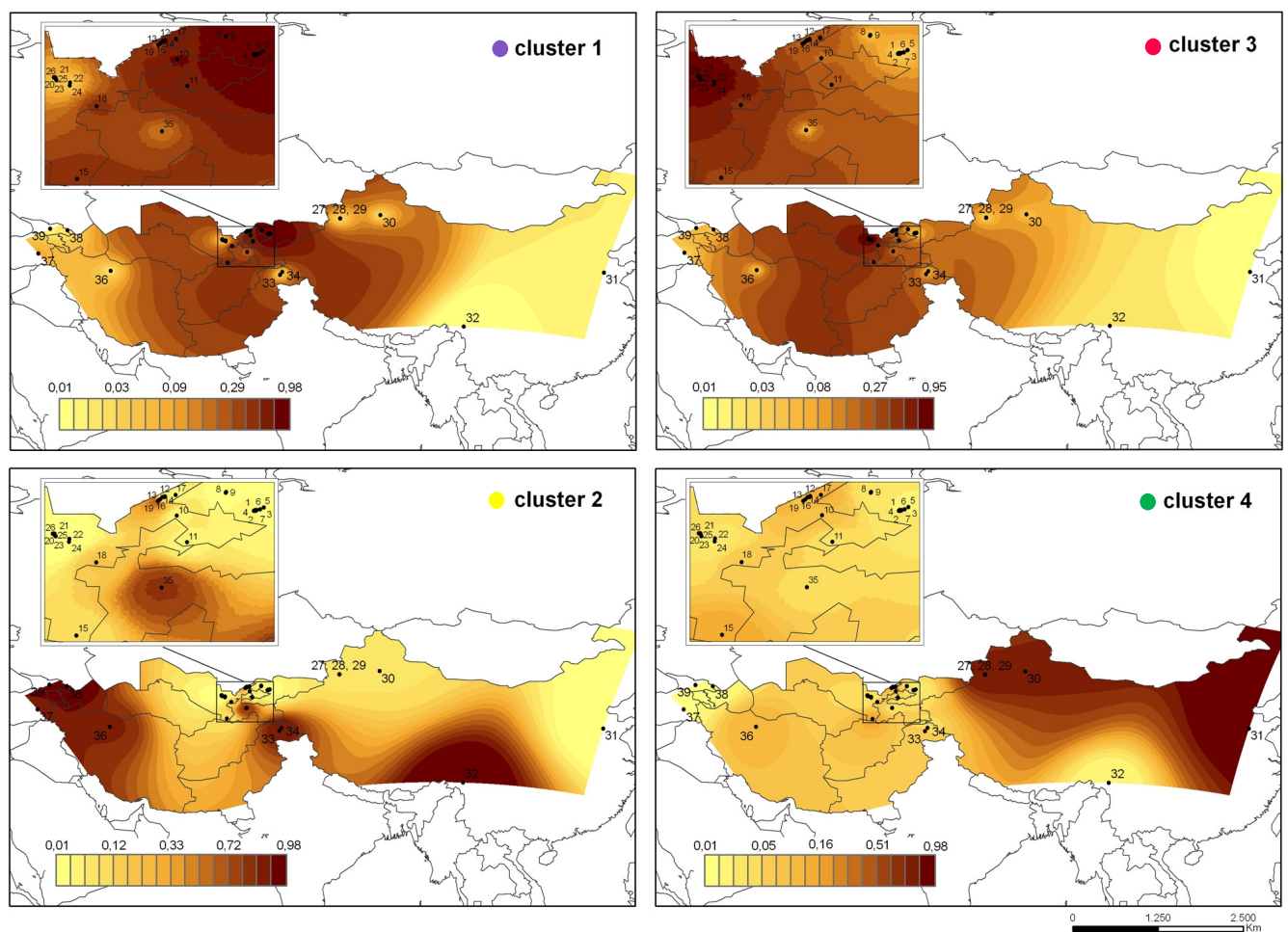


Fig. 4 – Clustering surface map per K=4, mappe di probabile appartenenza delle popolazioni ai 4 cluster stimati con STRUCTURE. I pallini colorati corrispondono ai colori dei profili genetici elaborati con STRUCTURE 2.3.3 rappresentati in fig. 5.

Gongliu-2 e Dashaicum (sub-cluster 1) sono separati da quelli di Lagodekhi, Skra (sub-cluster 2), Anatolia, Karaj, Karankul, Shouli (sub-cluster 3) e Hunza e Gilgit (sub-cluster 4).

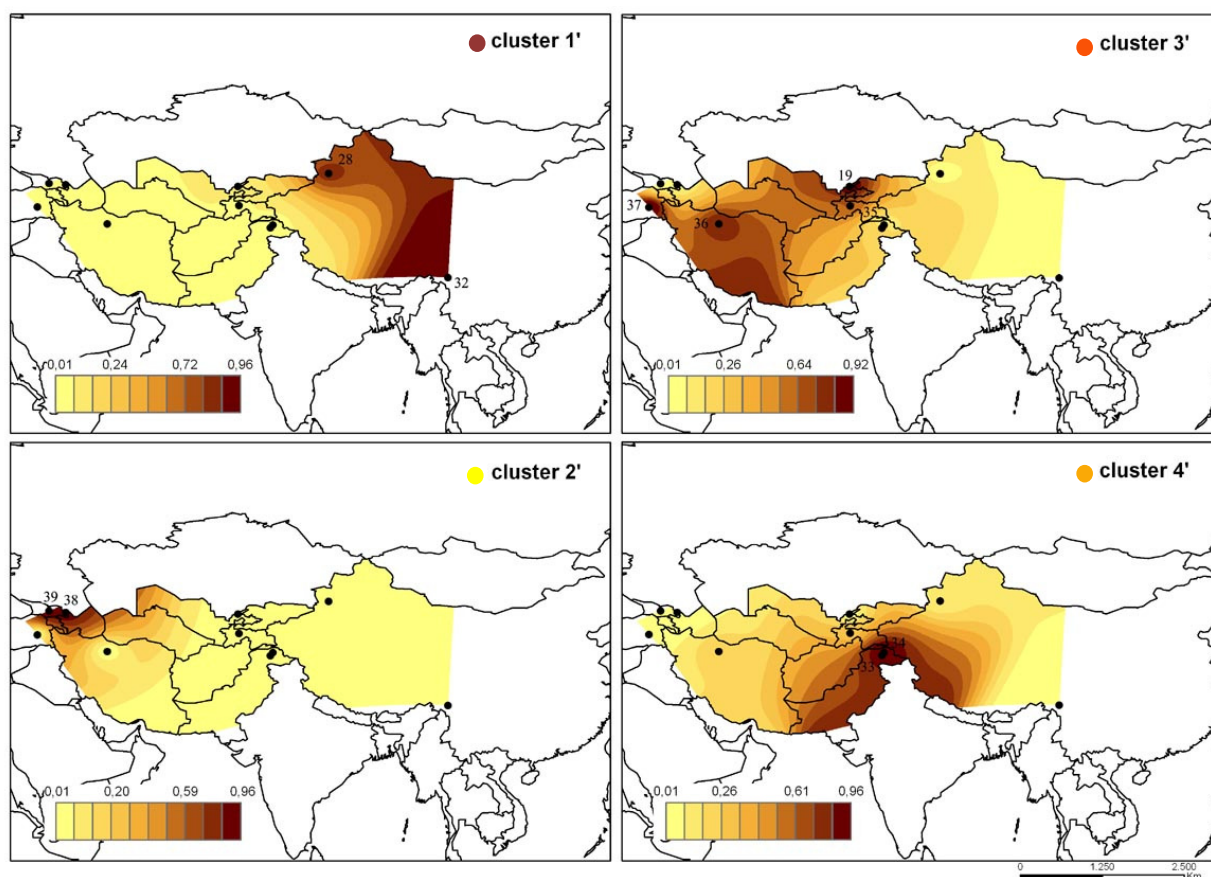


Fig. 6 – Clustering surface map della sub-struttura per $K'=4$, individuata all'interno del cluster 1.

L'algoritmo *maximum difference* di Monmonier, implementato nel software BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), ha identificato cinque barriere genetiche statisticamente significative (fig. 7).

La principale discontinuità genetica, con andamento longitudinale, separa le popolazioni dell'Asia occidentale (Georgia, Turchia e Iran) da quelle centro-orientali. Un'altra barriera divide le popolazioni occidentali in due sub-regioni, separando le popolazioni della Georgia da quelle turche e iraniane. Nell'Asia centrale ulteriori barriere separano le popolazioni di noce in quattro gruppi principali: (1) popolazioni dell'Uzbekistan centro-orientale, (2) popolazioni dell'Uzbekistan orientale e Kirgizstan occidentale, (3) cinque popolazioni della Cina centro-orientale e (4) cinque popolazioni del Tajikistan, Pakistan e Tibet. I siti di campionamento e le cinque barriere genetiche individuate sono state rappresentati sulla base del modello globale di elevazione del terreno (GTOPO30) in figura 7. Questa mappa indica approssimativamente le montagne dell'Himalaya, del Tien Shan, del Pamir dell'Hindu Kush e Zagros come le presunte barriere al flusso genico tra le popolazioni di noce persiano. Inoltre la presenza dei deserti Karakum, Kyzyl Kum e Taklamakan nell'Asia centro-occidentale potrebbe avere influenzato la differenziazione genetica delle popolazioni di *J. regia*.

Esiste una significativa correlazione tra i valori di differenziazione genetica linearizzati [$F_{ST}/(1-F_{ST})$] e il logaritmo naturale della distanza geografica tra due siti di campionamento (Mantel test $r^2=0.3904$, $P=0.0002$). Questo risultato supporta l'ipotesi di un effetto di isolation by distance sul flusso genico tra le popolazioni di noce persiano nell'area nativa.

Tuttavia il Mantel test ha evidenziato correlazioni positive tra la presenza di catene montuose e / o deserti e la divergenza genetica tra coppie di popolazioni (F_{ST} linearizzato; $r^2=0.4466$, $P=0.0002$) e la distanza geografica lineare ($r^2=0.5854$, $P=0.0002$) tra le popolazioni. Inoltre, la correlazione parziale di F_{ST} linearizzato e la matrice presenza / assenza catene montuose / deserto è comunque significativa dopo aver considerato l'effetto del logaritmo naturale delle distanze lineari tra popolazioni (partial Mantel test $r^2=0.1401$, $P=0.0002$). Infine, la procedura BIOENV (Clarke and Ainsworth 1993) è stata utilizzata per esplorare la possibile correlazione tra la struttura genetica, espressa in F_{ST} tra le coppie di popolazioni, e le 12 variabili bioclimatiche selezionate. La combinazione precipitazioni medie (P_{sum}) dei quattro mesi estivi (Giugno, Luglio, Agosto e Settembre) e indice di continentalità (I_C) mostra la più alta correlazione con i valori di F_{ST} , rispetto alle altre possibili combinazioni di variabili bioclimatiche. Questo potrebbe indicare una parziale coincidenza della struttura genetica delle popolazioni di noce con la loro ripartizione in sette regioni fitogeografiche.

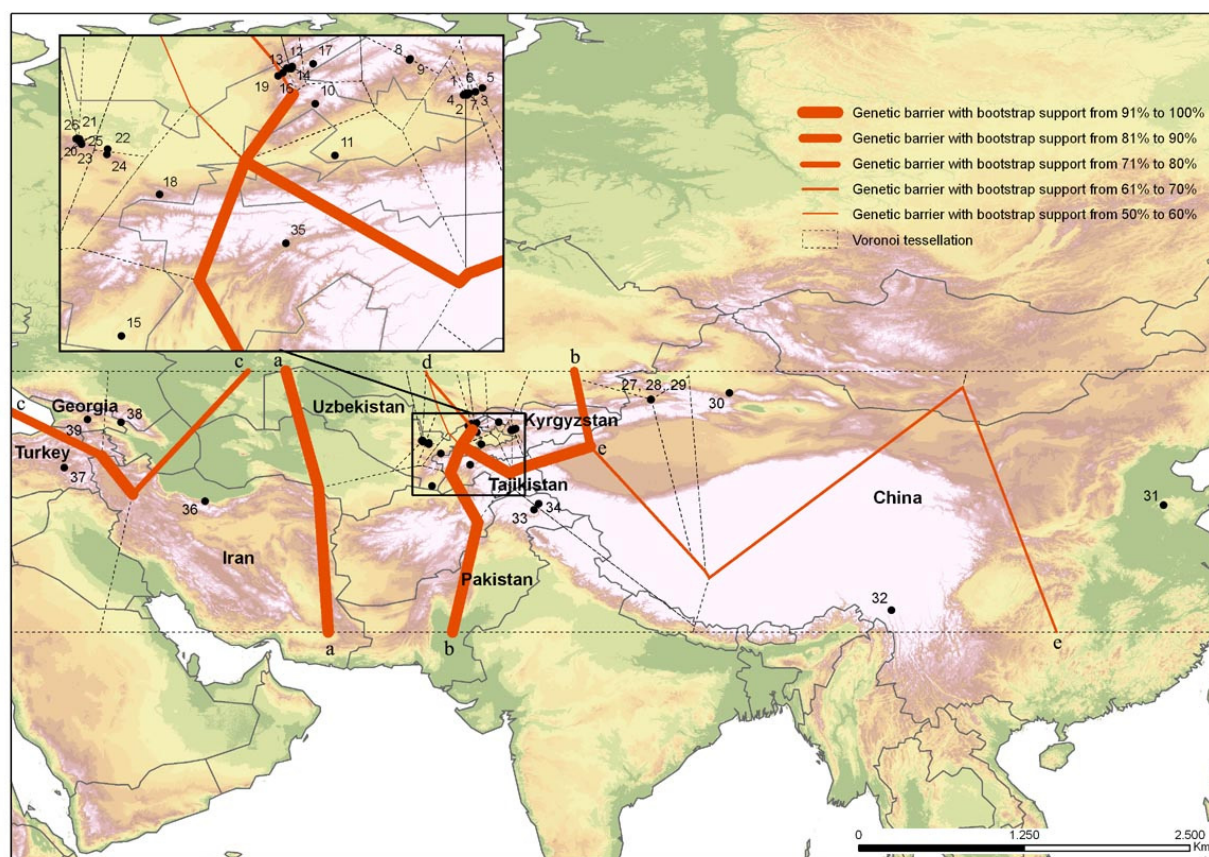


Fig. 7– Cinque barriere genetiche (a, b, c, d, e), statisticamente significative, identificate tra le 39 popolazioni di *J. regia* con il software BARRIER.

4.4 Discussione

Sebbene l'origine del noce comune non sia ancora del tutto nota, è considerata tradizionalmente nativa di una regione che va dall'Europa sud-orientale, attraversa l'Asia centrale fino alla Cina nord-occidentale (Xinjiang) (Huntley & Birks 1983). Partendo dallo Xinjiang e/o dal Tibet, dove ancora si ritrova sia nelle forme selvatiche che coltivate, *J. regia* è stata probabilmente diffusa per azione antropica nella Cina centrale e orientale. I risultati presentati in questo caso di studio si accordano con questa tesi, offrendo un valido e innovativo contributo alle attività di ricerca del progetto WA.L.NET. I risultati indicano che esistono tuttora diversi centri di diversità genetica nel Caucaso e nelle regioni montuose dell'Asia centrale, dove *J. regia* è sopravvissuta dopo le glaciazioni del Pleistocene. Inoltre sono state individuate una ben definita struttura genetica ed evidenti discontinuità genetiche tra le popolazioni di noce. L'*overlay technique* seguita, nell'applicazione degli innovativi principi della *landscape genetics*, suggerisce che le attuali risorse genetiche di noce siano il risultato della combinazione di due fattori: la distanza geografica e la resistenza espressa dalle caratteristiche della matrice paesaggistica. È possibile ipotizzare che la presenza di imponenti catene montuose (Himalaya, Tien Shan, Pamir, Hindu Kush, Zagros) e la progressiva desertificazione dell'Asia centrale durante l'Olocene abbia causato ripetuti eventi di frammentazione e di isolamento genetico delle popolazioni di noce dopo l'ultimo periodo di massima espansione glaciale.

Sono stati individuati due principali centri di diversità genetica per il noce nella sua area nativa: il primo localizzato nella regione del Caucaso (Georgia e Turchia), il secondo individuato nelle regioni montuose dell'Asia centrale, che includono Himalaya (Tibet- Cina, Kashmir- Pakistan), Pamir settentrionale (Tajikistan), monti Zaamin, monti Gissar settentrionali e parte delle montagne del Tien Shan (Uzbekistan orientale, e provincia Xinjiang, Cina). Le tracce di polline fossile indicano che questi picchi di diversità genetica si ritrovano in macro regioni dove *J. regia* è sopravvissuta dopo le glaciazioni pleistoceniche. È possibile che i rifugi glaciali abbiano ospitato e mantenuto specie con più alti livelli di diversità genetica rispetto alle aree ricolonizzate dopo l'ultima glaciazione. Allontanandosi dalle aree rifugio, le popolazioni di una specie mostrerebbero una diversità genetica progressivamente più bassa. Questa diminuzione nella diversità genetica può essersi verificata durante i processi di migrazione dopo l'ultimo massimo glaciale, a causa del ripetersi di eventi del fondatore e di bottleneck.

Le zone rifugio sono considerate riserve di ricchezza allelica (Widmer & Lexer 2001). Tuttavia l'ibridazione tra popolazioni di piante originatesi da diversi rifugi glaciali potrebbe promuovere un aumento nella diversità genetica nelle aree ricolonizzate (Petit et al. 2003)

A dispetto della presenza di alti livelli di diversità genetica, sono stati trovati valori di inbreeding significativamente elevati nel 48.72 % dei campioni di noce esaminati. Ogni popolazione campionata si presenta quasi completamente isolata geograficamente e circondata da aridi bassipiani continentali, versanti montuosi e altipiani steppici. Infatti l'isolamento geografico e la riduzione o frammentazione dei popolamenti naturali sembra promuove fenomeni d'inbreeding nel tempo (Pautasso 2009).

L'analisi della struttura genetica mostra una suddivisione delle popolazioni di *J. regia* in quattro cluster principali: il primo corrispondente ai genotipi del Kirgizstan, provenienti dalle montagne del Tien Shan occidentale (Asia centrale); il secondo predominante in Asia occidentale e centro-meridionale, include individui provenienti da Georgia, Turchia, Iran, Tajikistan, Pakistan e Tibet e da Karankul (Uzbekistan); il terzo costituito da individui provenienti da Nurata nell'Uzbekistan centro-orientale; infine il quarto, costituito da individui provenienti dalla Cina orientale e settentrionale (province dello Xinjiang e Shandong). Le popolazioni dell'Uzbekistan orientale (Tien Shan occidentale) mostrano, invece, admixture tra il cluster 1 e il cluster 3. La cluster analysis mostra un'ulteriore suddivisione del cluster 2 in quattro sub-cluster che separano tutti gli alberi di noce del Tibet e 10 genotipi provenienti da Gongliu-2 (sub-cluster 1) dalla Georgia (sub-cluster 2), Turchia, Iran, Tajikistan, Karankul-Uzbekistan orientale (sub-cluster 3), e Pakistan (sub-cluster 4). È evidente che la maggior parte delle popolazioni di *J. regia* sono confinate tra diverse catene montuose, mostrando una struttura fitogeografica ben distinta. Quindi la netta separazione delle 39 popolazioni di *J. regia* in quattro gruppi principali e quattro sottogruppi, potrebbe in parte derivare dalla complessa struttura topografica degli habitat, dalla presenza di elevate montagne, profonde valli e deserti, che hanno impedito il flusso genico tra le popolazioni durante l'Olocene.

Inoltre, come indicato dalle testimonianze dei polline fossile, la complessità geografica della area nativa di *J. regia* avrebbe favorito l'identificazione di multipli rifugi glaciali isolati, dai quali si sarebbe avviata la differenziazione genetica delle attuali popolazioni di noce persiano. In particolare, le imponenti catene montuose e alcune variabili ambientali (ad es. la temperatura, le precipitazioni ecc.) sono caratteristiche del paesaggio che possono aver agito da barriere alla dispersione e al flusso genico (Hewitt 2004), influenzando le rotte di migrazione delle specie arboree delle foreste temperate dopo l'ultimo glaciale massimo. Anche il Mantel test e il partial Mantel test supportano come modello di espansione di *J. regia* nell'areale nativo l'isolation-by-distance, favorito dalla combinazione dei fattori distanza geografica e resistenza della matrice paesaggistica. L'identificazione di cinque presunte barriere genetiche ha portato ad identificare, inoltre, i monti Zagros, le montagne dell'Hindu Kush, del Pamir, del Tien Shan, dell'Himalaya e i deserti del Karakum, del Kyzyl Kum e del Taklamakan come le presunte barriere al flusso genico tra i quattro gruppi e i quattro sub-cluster desunti di popolazioni di noce.

In conclusione, si ritiene che la presenza di imponenti catene montuose (Himalaya, Tien Shan, Pamir, Hindu Kush, Zagros) e la progressiva desertificazione dell'Asia centrale durante l'Olocene abbiano causato ripetuti eventi di frammentazione e di isolamento genetico delle popolazioni dopo l'espansione post-glaciale. Questi eventi avrebbero quindi favorito l'attuale struttura genetica delle popolazioni di *J. regia* nell'area nativa. Però la presenza di livelli di admixture in nove popolazioni dell'Asia centrale fanno ipotizzare che frequenti scambi di germoplasma di noce si siano verificati ad opera dell'uomo grazie alla presenza delle antiche vie di comunicazione (Vie della Seta), che favorivano gli scambi commerciali tra la Cina e il bacino del Mediterraneo. Questi corridoi, che collegavano popolazioni umane molto distanti possono avere facilitato il flusso genico e ampliato il range di distribuzione di *J. regia*. Sebbene i risultati fino ad ora raggiunti siano molto soddisfacenti la discussione sull'origine del noce è ancora aperta. Nel prossimo futuro sarà approfondito lo studio sul processo di domesticazione di *J. regia* per valutare l'influenza del ruolo avuto dall'uomo nella storia evolutiva del noce.

5. Quarto caso di studio: Analisi spaziali per la tracciabilità dell'origine geografica di oli extravergini di oliva

Il gruppo di ricerca di ecofisiologia vegetale del CNR IBAF è impegnato da alcuni anni nel progetto “Applicazione degli isotopi stabili per la caratterizzazione geografica dell’olio extravergine di oliva italiano”. Nell’ambito di questo progetto si colloca l'ultimo caso di studio. Si tratta di un contributo innovativo per lo studio della tracciabilità dell'origine geografica di oli extra vergine di oliva, frutto della combinazione delle tecniche di analisi degli isotopi stabili e delle analisi spaziali dei valori isotopici discriminati. Costituisce un primo tentativo di integrare le analisi *isoscares* in studi di tracciabilità degli oli di oliva.

5.1 Introduzione

Qualità, origine e sicurezza degli alimenti, nonostante le garanzie offerte dalla legislazione europea e nazionale, sono spesso messe in discussione da inadeguatezze lungo la filiera, da adulterazioni e da frodi. Per questo è sempre più sentita, anche presso i produttori, la necessità di garantire tracciabilità e rintracciabilità degli alimenti. L’analisi di tracciabilità della provenienza geografica degli alimenti rappresenta una condizione importante per tutelare i prodotti ad origine controllata e protetta (DOP Denominazione di Origine Protetta, IGP Indicazione Geografica Protetta, prodotti biologici), ai quali il consumatore è disposto ad accordare un valore aggiunto, e per garantirne la sicurezza.

La ricerca scientifica offre metodologie in grado di certificare sicurezza e origine degli alimenti, garantendo l’assenza di sostanze nocive per la salute e verificando che il territorio d’origine dell’alimento sia effettivamente quello dichiarato nell’etichetta.

Le produzioni agro-alimentari di qualità rappresentano una delle prospettive più promettenti per le aziende agricole italiane, in special modo nel quadro della globalizzazione dei mercati e nella competizione con agricolture più estensive e/o remunerative. In questo quadro, la qualificazione del prodotto e la competitività non possono essere basate sul prezzo, ma si deve puntare invece a standard qualitativi elevati che consentano un maggior valore aggiunto e un valore commerciale più elevato.

La politica dell’Unione Europea prevede il controllo obbligatorio degli alimenti, lungo tutta la filiera di produzione. Dal 2005 è divenuto obbligatorio adottare in tutta l’Unione Europea sistemi di rintracciabilità degli alimenti. La rintracciabilità è intesa come *‘la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare (o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime) attraverso*

tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione'. Sono quindi divenuti fondamentali i protocolli di tracciabilità e di rintracciabilità degli alimenti e delle loro componenti. Per tracciabilità si intende il processo che identifica e registra, tramite azioni e informazioni specifiche, le tracce che il prodotto lascia durante le diverse fasi della filiera produttiva, da monte a valle. Mentre con il termine rintracciabilità si intende il processo inverso (da valle a monte); in concreto, rintracciare significa stabilire lo strumento documentale e tecnico (o analitico) più idoneo per ricostruire a posteriori, a partire dal prodotto alimentare finito, il suo percorso e la sua storia (origine geografica e trasformazioni successive) (Brugnoli et al. 2007).

I recenti progressi nella spettrometria di massa isotopica, accoppiata all'analisi elementare ed alla pirolisi, consentono la misura dei rapporti isotopici di vari elementi leggeri e l'identificazione dell'origine geografica di prodotti agroalimentari quali l'olio extravergine di oliva. (Brugnoli et al. 2007, Angerosa et al. 1999).

L'olivo, *Olea europaea* L., è la più importante coltura per la produzione di olio nel bacino del Mediterraneo, l'Italia è uno dei più forti produttori insieme a Spagna e Grecia. La qualità dell'olio è influenzata dai fattori più diversi, quali tecniche agronomiche, condizioni stagionali, stato di salute delle drupe, stadio di maturazione, sistemi di raccolta e di trasporto delle olive, metodo e durata della conservazione, tecnologie di preparazione. Da diversi anni, accanto alle analisi convenzionali di legge che definiscono la qualità di un olio di oliva, viene utilizzata la spettrometria di massa per i rapporti isotopici (IRMS) la quale, insieme ad un'appropriata analisi statistica multivariata, consente uno studio più approfondito del prodotto in relazione alla propria origine geografica (Mannina et al. 2001). Infatti, gli isotopi stabili permettono di riconoscere molecole, presenti nei prodotti in studio, aventi la stessa struttura chimica ma provenienti da materie prime diverse o preparate con processi diversi, come ad esempio è il caso della sintesi biologica rispetto a quella industriale. Così queste metodologie sono frequentemente utilizzate per verificare l'autenticità di diversi prodotti alimentari e nella difesa dalle frodi.

I rapporti isotopici nella sostanza organica vegetale hanno valori diversi a seconda dell'area di origine (latitudine, altitudine, distanza dal mare), del clima (temperatura, umidità, piovosità), delle caratteristiche geologiche, delle pratiche di concimazione adottate, della specie e della cultivar (Iacumin et al. 2009). Tali variazioni naturali dell'abbondanza isotopica (frazionamento isotopico) sono conseguenza delle diverse proprietà chimico-fisiche degli isotopi di uno stesso elemento dovute alla loro differente massa e spin nucleare.

La composizione isotopica dell'acqua (D/H e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in una qualsiasi posizione geografica è legata al ciclo idrologico del luogo, ai fenomeni atmosferici globali e ai rapporti isotopici del luogo di origine delle masse di vapore (Brugnoli et al. 2007). Poiché l'acqua meteorica è la maggiore

sorgente idrica per le piante, l'analisi isotopica di piante cresciute in ambienti diversi, ancorché vicini, fornirà risultati diversi per gli isotopi di idrogeno e ossigeno.

La distribuzione degli isotopi stabili del carbonio nel mondo vivente è invece determinata, in maniera preponderante, dal frazionamento isotopico durante la fissazione fotosintetica di CO₂. (Brugnoli & Farquhar 2000). La sostanza organica vegetale risulta impoverita in ¹³C rispetto alla composizione isotopica della CO₂ dell'aria, con esiti diversi a seconda del metabolismo e delle condizioni ambientali (Brugnoli & Farquhar 2000). Esiste, quindi, una sostanziale variabilità (circa 15‰) nella composizione isotopica di piante a metabolismo C3 (ad es. frumento, riso, vite, olivo ecc.) rispetto a quelle a ciclo C4 (ad esempio mais e canna da zucchero) e ciclo CAM (piante grasse). In aggiunta, l'effetto di frazionamento isotopico dipende fortemente dalla disponibilità idrica per le piante; più in generale, eventuali stati di stress modificano fortemente la composizione isotopica. È quindi evidente come anche la composizione isotopica del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) possa essere utilizzata per distinguere le origini geografiche di materiale biologico, in virtù della diversa inclinazione ambientale a determinare il grado di stress (es., pedo-climi aridi, temperati, sub-umidi). In base alla sua composizione chimica l'olio extravergine di oliva può essere caratterizzato geograficamente per la sua composizione di ¹³C, ¹⁸O e D. Ad esempio, combinando le composizioni isotopiche calcolate dalla determinazione dei rapporti isotopici ¹⁸O/¹⁶O e ¹³C/¹²C negli oli, si possono ottenere informazioni caratterizzanti l'origine geografica dei campioni analizzati.

I progressi nella spettrometria di massa isotopica, la maggiore disponibilità di dati isotopici insieme al continuo sviluppo delle tecnologie GIS e alla creazione di ampi dataset spaziali, costituiscono i fattori di base che hanno portato alla nascita degli approcci *isoscares* (West et al. 2010). Questo termine, derivato letteralmente dalla fusione dei termini *isotopes* e *landscapes*, indica modelli spazialmente espliciti per comprendere e quantificare la distribuzione spazio-temporale della variabilità dei rapporti isotopici nei sistemi naturali. Oltre a fornire un'utile rappresentazione cartografica delle variazioni isotopiche, un *isoscape* rappresenta un fondamentale strumento di indagine dei processi e delle cause alla base delle stesse variazioni.

5.2 Materiali e metodi

Nell'ambito delle attività di ricerca condotte presso il CNR-IBAF dal gruppo di ecofisiologia vegetale e spettrometria di massa per i rapporti isotopici, sono stati collezionati 387 oli italiani delle campagne olearie 2009, 2010 e 2011.

Sono state considerate due tipologie di dati: dati isotopici (dataset alfanumerico) e dati geografici e climatici (dataset spaziale). In questo caso studio sono stati considerati 122 campioni di olio della

campagna di raccolta 2009 provenienti dalle seguenti regioni italiane: Lombardia, Liguria, Toscana, Lazio, Molise, Puglia, Calabria, Sicilia e Sardegna.

Dati Isotopici

Le analisi IRMS hanno consentito la determinazione delle composizioni isotopiche $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ dei campioni di olio. Le composizioni isotopiche $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ sono state associate alle coordinate geografiche dei siti di provenienza. I dataset isotopici sono stati organizzati in un geo-database in ambiente ArcGIS 9.3.

Dati climatici

Dati climatici sono stati acquisiti dal WorldClim Data Center (<http://www.worldclim.org>; Hijmans et al. 2005), che dispone di quattro variabili climatiche mensili e 18 variabili bioclimatiche per l'intero globo, eccetto l'Antartide, per l'arco temporale che va dal 1950 al 2000. I layer (derivati da tecniche di interpolazione spaziale di misure di parametri climatici) sono forniti in formato ESRI grid (a diverse risoluzioni spaziali da 30 secondi di arco a 2.5, 5 e 10 minuti di arco) e sono espressi in latitudine e longitudine; il Datum di riferimento è WGS84. I dati climatici sono mediati su 50 anni.

Le variabili climatiche mensili, acquisite alla risoluzione di 2.5 minuti di arco sono le seguenti: valori medi delle temperature minime (*tmin*), medie (*tmean*) e massime mensili (*tmax*) espresse in °C $\times$ 10, e valori medi delle precipitazioni mensili (*prec*) espressi in mm per l'area in esame. Per ogni variabile sono stati acquisiti 12 file grid, uno per ogni mese dell'anno, per un totale di 48 file organizzati in un geo-database.

Analisi isoscapes

I dataset isotopici, note le coordinate dei siti di provenienza, sono stati impiegati in analisi *isoscapes* (West et al. 2010). Per quanto noto in letteratura, questo risulta essere il primo approccio di analisi *isoscapes* applicato in studi di tracciabilità di oli extra-vergini di oliva. I valori di composizione isotopica $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$, associati a ciascuna provenienza, sono stati interpolati tramite tecniche geostatistiche (IDW e kriging). Sono state, così, elaborate superfici rappresentative della variazione isotopica $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ degli oli per l'areale di campionamento (fig.2).

Correlazione tra dati isotopici e dati climatici

È stata valutata la correlazione tra la composizione isotopica degli oli e l'indice xerotermico, così come calcolato in accordo a Grossmann et al. (2002):

$$Xi = \Sigma(2TM - P) \quad \text{se } 2TM > P$$

$$Xi = 0 \quad \text{se } 2TM < P$$

dove TM è la media della temperatura massima e minima mensile, P rappresenta la precipitazione media mensile. L'indice xerotermico è stato scelto come variabile climatica, potenzialmente discriminativa delle condizioni climatiche dell'area mediterranea, in grado di quantificare il livello medio di stress idrico cui ciascuna area è incline.

Le variabili climatiche acquisite dal WorldClim Data Center sono state utilizzate per il calcolo dell'indice xerotermico. La funzione di analisi spaziale, *Raster Calculator*, disponibile in ArcGIS 9.3, consente di elaborare calcoli matematici, attraverso funzioni e operatori matematici, con dati sia in formato raster che vettoriale. La procedura di calcolo ha previsto diversi step:

- 1) calcolo della media tra temperatura massima e minima mensile per ogni mese dell'anno (TM) sulla base degli input file grid $tmin$ e $tmax$. Sono stati calcolati 12 output file grid TM .
- 2) Calcolo della sommatoria dei file grid TM .
- 3) Calcolo della sommatoria dei file grid P (precipitazioni medie mensili).
- 4) Calcolo dell'indice xerotermico per $2TM > P$. L'indice Xi è nullo quando $2TM < P$.

Il file grid ottenuto esprime i valori dell'indice xerotermico per l'intero globo. La funzione *Clip Raster* ha consentito di estrarre i valori di Xi per la Penisola italiana.

Infine la funzione di analisi spaziale *Extract Value to Point*, disponibile nel modulo Spatial Analyst, ha consentito di selezionare per ogni sito di provenienza degli oli il valore dell'indice Xi . I valori Xi selezionati sono stati correlati ai valori dei rapporti isotopici $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ mediante un'analisi di regressione lineare.

5.3 Risultati

Le analisi degli oli allo spettrometro di massa per i rapporti isotopici (IRMS) hanno individuato una relazione tra le composizioni isotopiche $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e latitudine, temperatura e pioggia, valutando anche l'effetto stagionale. I campioni del nord hanno una composizione isotopica più leggera sia in carbonio che ossigeno; quelli delle isole risultano arricchiti per entrambe le composizioni isotopiche. Si sono distinte quattro aree geografiche sulla base della clusterizzazione dei dati isotopici: nord, Tirreno centro-meridionale, Adriatico centro-meridionale e isole.

L'analisi *isoscap* ha prodotto superfici rappresentative della variazione isotopica $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ degli oli per l'areale di campionamento, rappresentate in figura 2A e 2C. Questo innovativo metodo di rappresentazione dei dati isotopici mette in evidenza l'esistenza di forti relazioni latitudinali: lungo il transetto nord - sud si ha arricchimento in entrambe le composizioni isotopiche di O e C (in figura

colori aranciati). Un parziale effetto longitudinale è testimoniato, inoltre, da un maggiore arricchimento nei campioni provenienti da Sicilia e Sardegna.

L'indice xerotermico (Grossmann et al. 2002) calcolato per la penisola italiana, è rappresentato in figura 2B. Alti valori dell'indice xerotermico si riscontrano nelle zone insulari e lungo le coste meridionali dell'arco ionico, a denunciare condizioni di prolungata siccità estiva. La fascia costiera tirrenica, caratterizzata da una media intensità dello stress estivo, mostra valori intermedi di X_i ; valori molto bassi caratterizzano la fascia periappenninica ad indicare una situazione di carenza idrica estiva del tutto moderata; valori nulli caratterizzano la freschezza ed umidità della zona appenninica e dell'arco alpino. L'analisi di regressione lineare tra X_i e i rapporti isotopici $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ è risultata altamente significativa in entrambi i casi (rispettivamente $r=0.64$, $p<0.05$; e $r=0.54$, $p<0.05$) (fig. 1). L'esistenza di un forte determinismo sui dati isotopici da parte del parametro X_i emerge chiaramente dalle figure 2A, 2B e 2C.

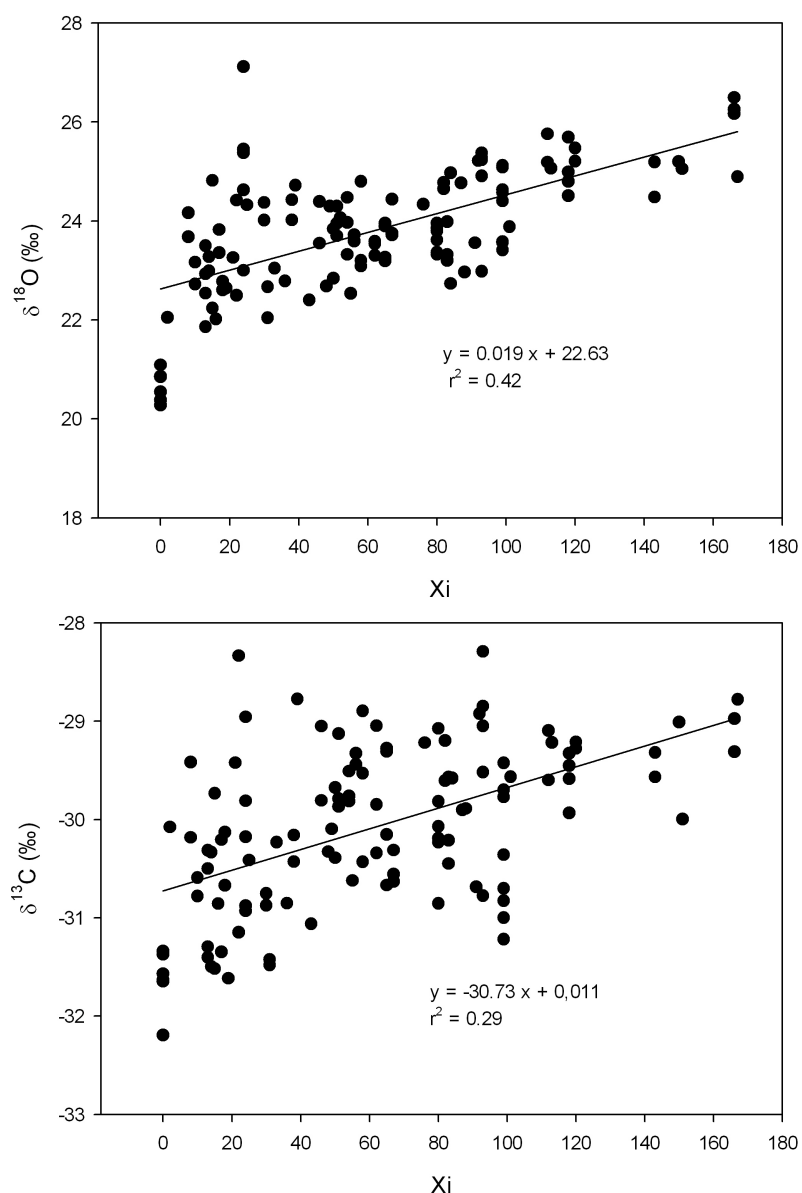


Fig. 1 – Regressione lineare tra X_i e i rapporti isotopici $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ dei 122 campioni di oli italiani.

5.4 Discussione

I risultati esposti costituiscono un innovativo contributo allo studio della tracciabilità dell'origine geografica di oli extra vergine di oliva nel territorio italiano. La combinazione delle tecniche IRMS con quelle di analisi spaziale ha consentito di rappresentare la variabilità spaziale della composizione isotopica degli oli di oliva italiani. L'applicazione delle medesime tecniche analitiche ai dataset isotopici delle campagne 2010 e 2011 consentirà un'analisi spaziale e temporale della variabilità isotopica degli oli italiani. I risultati attesi apriranno la prospettiva di costruire un modello *isoscape* basato sulle variazioni spazio-temporali della composizione isotopica degli oli extravergine di oliva italiani.

La visualizzazione di regioni omogenee, sulla base dell'interpolazione spaziale, fornisce di fatto una zonazione delle firme isotopiche attese a garanzia della provenienza di un olio extra-vergine. Al di là di questo primo tentativo di tracciare un *isoscape* sull'origine dell'olio, la metodologia appare promettente nel definire un protocollo di analisi di dati georeferenziati, con il fine della lotta alle frodi ed adulterazioni nel settore agroalimentare.

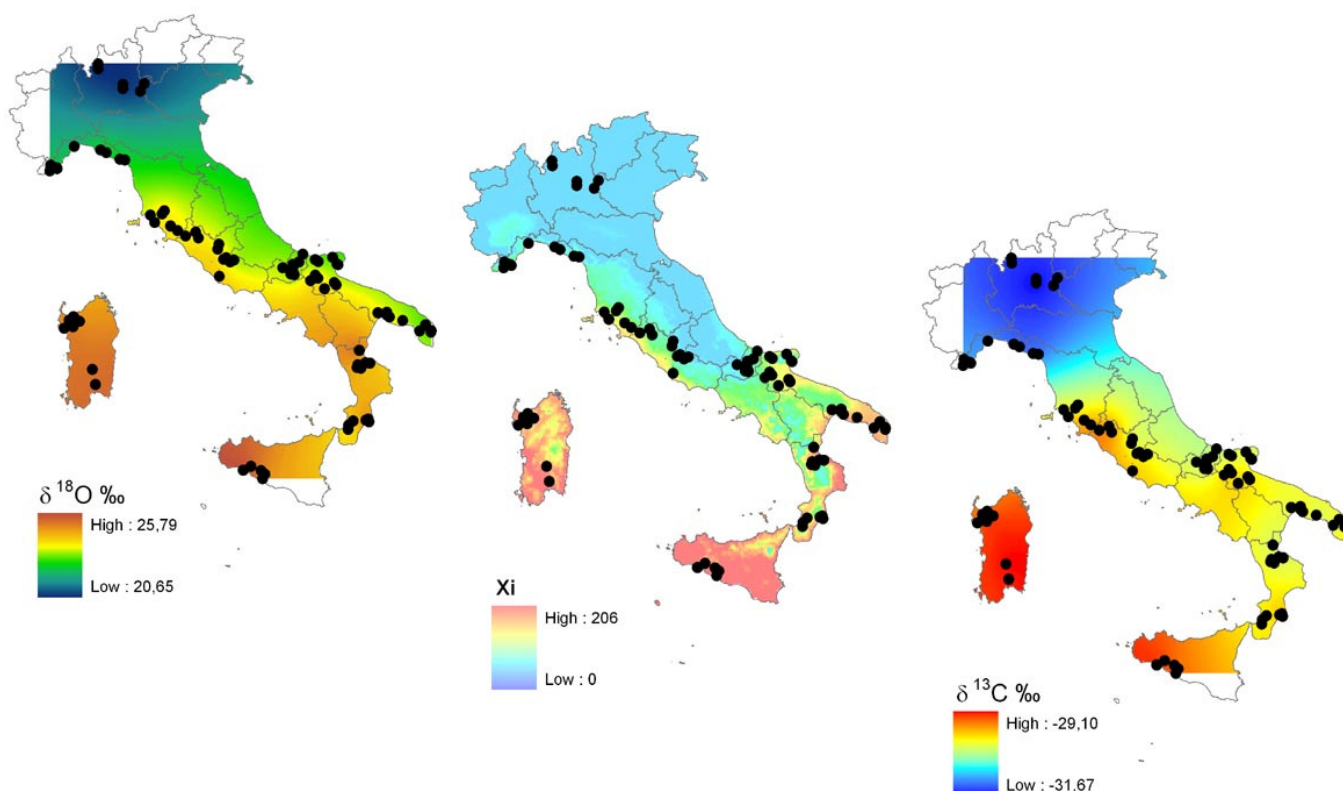


Fig. 2 – Variazioni della composizione isotopica $\delta^{18}\text{O}$ (A) e $\delta^{13}\text{C}$ (C) di oli extravergine di oliva italiani, confrontate con l'indice xerotermico (Grossmann et al. 2002) calcolato per il territorio italiano (B).

6. Conclusioni e considerazioni generali

In questa tesi di dottorato sono state indagate le potenzialità di applicazione delle analisi spaziali in studi finalizzati alla sostenibilità e conservazione di risorse agro-forestali.

I quattro casi di studio presentati e discussi hanno mostrato la possibilità di coniugare ed integrare dati e metodi propri di diverse discipline scientifiche, quali l'ecologia e l'ecofisiologia, la genetica di popolazioni forestali e l'analisi del paesaggio attraverso l'utilizzo della tecnologia GIS e delle analisi spaziale, che si sono dimostrati strumenti fondamentali in studi a carattere interdisciplinare.

Nel primo caso di studio l'applicazione delle tecniche di analisi spaziale ha consentito di quantificare gli effetti a livello locale dell'azione antropica sulla foresta amazzonica, fornendo gli strumenti per definire adeguate strategie per il recupero forestale sostenibile. Le azioni pianificate, benchè proposte su scala locale, affrontano temi di rilevanza globale, e possono contribuire alla conservazione della biodiversità amazzonica.

La sperimentazione dell'*overlay technique* nel secondo caso di studio, attraverso la combinazione di analisi geostatistiche e analisi della struttura genetica mediante un approccio bayesiano, ha permesso di identificare la struttura genetica e le discontinuità genetiche tra le popolazioni europee di *C. sativa* esaminate.

La discussione del terzo caso di studio ha messo in luce ulteriormente le potenzialità analitiche dell'*overlay technique*, nel comprendere gli effetti che la struttura e natura della matrice paesaggistica hanno avuto sul flusso genico e sulla variabilità genetica delle popolazioni asiatiche di *J. regia* esaminate nell'area nativa.

Infine la combinazione delle tecniche di analisi degli isotopi stabili (IRMS) e di quelle di analisi spaziale, nel quarto caso di studio, ha consentito di rappresentare la variabilità spaziale della composizione isotopica di 122 campioni di oli di oliva italiani, fornendo il primo tentativo noto di analisi *isoscape* per lo studio della tracciabilità dell'origine geografica di oli extra vergini di oliva.

Dunque, le potenzialità di gestione, organizzazione, analisi spaziali di dati di diversa natura e provenienza, e di elaborazione di output cartografici, proprie degli strumenti GIS ben rispondono alla necessità di indagare la natura spaziale delle componenti biologiche, fisiche ed antropiche e le loro relazioni.

Le metodiche di analisi della *landscape genetics*, così come applicate allo studio della diversità genetica di specie forestali, hanno prodotto risultati estremamente interessanti e innovativi. Questi costituiscono una base primaria, sulla quale realizzare modelli di previsione della risposta adattativa delle specie ai cambiamenti climatici. La conoscenza della distribuzione dei principali pool genici di specie forestali è indispensabile per definire adeguate strategie per la conservazione della biodiversità. Anche l'approccio mediante *isoscapes* è particolarmente promettente nell'aprire nuove

frontiere di analisi e modellistica di processi ecologici. Al di là delle mostrate prospettive forensi, quali le applicazioni alla repressione frodi ed adulterazioni nel settore agroalimentare, studi sulle funzioni ecosistemiche, e di scala più larga verso la biosfera, sono attesi.

Questa tesi offre indicazioni sulle metodiche di analisi necessarie a definire strategie mirate alla sostenibilità e alla conservazione delle risorse naturali, nello scenario dei cambiamenti globali, in cui la trasformazione del territorio e l'utilizzazione non controllata delle risorse ambientali sono tra i maggiori responsabili della perdita di biodiversità.

7. Bibliografia

- Ahmed N, Mir JI, Mir RR, Rather NA, Rashid R, Wani SH, Shafi W, Mir H, Sheikh MA (2012). SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Physiol Mol Biol Plants* 18:149-160.
- Amaral S & Lima D'Alge JC (2009). Spatial data availability and its implications for sustainable development of the Brazilian Amazon. *Earth Science Information*, 2:193-203.
- Angerosa F, Bréas O, Contento S, Guillou C, Raniero F, Sada E (1999). Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1013-1017
- Anselin L, Syabri I, Kho Y (2009). GeoDa: an introduction to spatial data analysis. In Fischer MM, Getis A (eds) *Handbook of applied spatial analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg and New York, pp. 73-89.
- Aradhya M, Woeste K, Velasco D (2010). Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L). *Acta Hort* 861: 127-132.
- Ashimov K (1998). The condition of and prospects for scientific research in the Kyrgyzstan walnut-fruit forests. In: Blaser J, Carter J, Gilmour D editors. *Biodiversity and sustainable use of Kyrgyzstan's walnut-fruit forests*. English version, IUCN, Gland, Cambridge, Bern. 87–90.
- Bagnoli F, Vendramin GG, Buonamici A, Doulis G, González-Martínez C et al. (2009). Is *Cupressus sempervirens* native in Italy? An answer from genetic and paleobotanical data. *Mol Ecol* 18: 2276-2286.
- Balkenhol N, Waits LP, Dezzani RJ (2009). Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography* 32: 818-830.
- Beck JB, Schmuths H, Schaal BA (2008). Native range genetic variation in *Arabidopsis thaliana* is strongly geographically structured and reflects Pleistocene glacial dynamics. *Mol Ecol* 17: 902-915.
- Beer R, Kaiser F, Schmidt K, Ammann B, Carraro G, et al. (2008). Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin? *Quaternary Sci Rev* 27: 621-632.
- Bennett (2003). *Linkages in the Landscape the role of corridors and connectivity in wildlife conservation*.

- Bolstad P (2008). GIS Fundamentals, 3rd Edition. Atlas Books, Minnesota (Ed. 2008), p. 650.
- Bonnet E, Van der Peer Y (2002). ZT: a software tool for simple and partial Mantel Tests.-Ghent Univ.
- Brown LH (1981). The conservation of forest islands in areas of high human density. *African Journal of Ecology* 19:27-32.
- Brugnoli E & Farquhar GD (2000). Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood RC, Sharkey TD and Von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: physiology and metabolism. Advances in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 399-434.
- Brugnoli E, Manieri M (2007). L'applicazione degli isotopi stabili per la rintracciabilità e la caratterizzazione geografica degli alimenti: il caso degli oli extra-vergini di oliva, Ed. CNR – GAL Trasimeno-Orvietano.
- Câmara G, Souza RCM, Freitas UM, Garrido J (1996). SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modeling. *Computers & graphics* 20 (3), 395-403
- Camin F, Larcher R, Nicolini G, Bontempo L, Bertoldi D, Perini M et al. (2010). Isotopic and elemental data for tracing the origin of European olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 58(1):570-7.
- Carrión JS & Sanchez-Gomez P (1992). Palynological data in support of the survival of walnut (*Juglans regia* L.) in the western Mediterranean area during last glacial times. *J Biogeogr* 19: 623-630.
- Carrión JS, Yll EI, Walker MJ, Legaz AJ, Chaíns C, López A (2003). Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology and Biogeography* 12: 119–129.
- Chapuis MP, Estoup A (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24: 621–631.
- Cheddadi R, de Beaulieu JL, Jouzel J, Andrieu-Ponel V, Laurent JM, Reille M, Raynaud D, Bar-Hen A (2005). Similarity of vegetation dynamics during interglacial periods. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 13939-13943.
- Chen D, Zhang X, Kang H, Sun X, Yin S (2012). Phylogeography of *Quercus variabilis* based on chloroplast DNA sequence in East Asia: multiple glacial refugia and mainland-migrated island populations. *PlosOne* 7: e47268.

- Clarke K & Ainsworth M (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar Ecol Prog Ser* 92: 205-219.
- Clark J &, Hemery G, (2009). Outcomes from 15 years of hardwoods research at the northmoor trust. *Quarterly Journal of Forestry*. 103, 212-219.
- Conedera M, Krebs P, Tinner W, Pradella M, Torriani D (2004). The cultivation of *Castanea sativa* (Mill.) in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* 13: 161-179.
- Connor SE & Kvavadze EV (2008). Modelling late Quaternary changes in plant distribution, vegetation and climate using pollen data from Georgia, Caucaus. *J Biogeogr* 36: 529-545.
- Crawford NG (2010). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Mol Ecol Resour* 10: 556-557.
- Cressie NAC (1990). The origins of kriging. *Mathematical Geology* 22 (3): 239–252.
- Dale MRT & Fortin MJ (2009). Spatial Autocorrelation and Statistical Tests: Some Solution. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* 14: 188-206.
- de Almeida OT & Uhl C (1998). Planejamento do uso do solo do Município de Paragominas. *Serie Amazônia N° 09 – Bélem: Imazon*.
- Djamali M, Baumel A, Brewer S, Jackson ST, Kadereit JW et al (2012) Ecological implications of Cousinia Cass. (*Asteraceae*) persistence through the last glacial-interglacial cycles in the continental Middle East for the Irano-Turian flora. *Rev Palaeobot Palyno* 172: 10-20.
- Djamali M, Brewer S, Breckle W, Jackson ST (2012). Climatic determinism in phytogeographic regionalization: A test from the Irano-Turanian region, SW and Central Asia. *Flora* 207: 237-249.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol* 11: 2571–2581.
- Ebrahimi A, Fatahi R, Zamani Z (2011). Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. *Sci Hortic –Amsterdam* 130: 146-151.
- El Mousadik A & Petit RJ (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theor Appl Genet* 92: 832-839.

- ESRI (2001). ArcGis™ Geostatistical Analyst: statistical tools for data exploration, modelling, and advanced surface generation.
- European Communities, Commission Regulation (EC) No 1989/2003 (6 November 2003) amending Regulation (EEC) No 2568/91.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Farina A, 2001. *Ecologia del paesaggio. Principi, metodi ed applicazioni*. UTET Libreria, Torino
- Fearnside PM (2005). Deforestation in Brazilian amazonia: History, Rates and Consequence. *Conservation Biology* 19(3):680-688.
- Fearnside PM & Barbosa RI (2004). Accelerating deforestation in Brazilian Amazonia: Towards answering open questions. *Environmental Conservation* , 31: 7-10.
- Fearnside PM, Righi CA, Graça PMLA, Keizer EWH, Cerri CC, Nogueira EM and Barbosa RI (2009). Biomass and Greenhouse-Gas Emissions from Land-Use Change in Brazil's Amazonian "Arc of Deforestation": The states of Mato Grosso and Rondônia. *Forest Ecology and Management*, 258 (9), pp.1968.
- Felsenstein J (2005). PHYLIP (phylogeny inference package). Seattle (WA): Department of Genome Sciences. University of Washington.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). *Global Forest Resources Assessment 2005: Progress Towards Sustainable Forest Management* (Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome, Italy).
- Fornari B, Malvolti ME, Turchini D, Fineschi S, Beritognolo I, et al. (2001). Isozyme and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalised European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Acta Horti* 544: 167–178.
- Fortin MJ & Dale MRT (2005). *Spatial Analysis: A guide for Ecologists*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Giglio L, Csiszar I, Justice CO (2006). Global distribution and seasonality of active fires as observed with the Terra and Aqua MODIS sensors. *Journal of Geophysical Research - Biogeosciences*, Vol 111, G02016, doi:10.1029/2005JG000142.
- Grivet D, Sork VL, Westfall RD, Davis FW (2008). Conserving the evolutionary potential of California valley oak (*Quercus lobata* Née): a multivariate genetic approach to conservation planning. *Mol Ecol* 17:139-156.
- Grossmann A, Romane F, Grandjanny M (2002). The Climate Environment of the ‘CASCADE’ Sites. II Report CNRS-CEFE for the EU Project EVK2-CT-1999-00006.
- Gugerli F, Rüegg M, Vendramin GG (2009). Gradual decline in genetic diversity in Swiss stone pine populations (*Pinus cembra*) across Switzerland suggests postglacial re-colonization into the Alps from a common eastern glacial refugium. *Bot Helv* 119: 13-22.
- Gunn BF, Aradhya M, Salick JM, Miller AJ, Yongping Y et al. (2010). Genetic variation in walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*; Juglandaceae): species distinctions, human impacts, and the conservation of agrobiodiversity in Yunnan, China. *Am J Bot* 97: 660-671.
- Hack DR (2005). Issues and challenges in the application of Geostatistics and Spatial-Data Analysis to the characterization of sand-and-gravel resources. U.S. Geological survey, <http://pubs.usgs.gov/bul/b2209-j/> , 14 pg.
- Halle S (2007). Science, art or application – the “Karma” of restoration ecology. *Restoration Ecology*, 15 (2): 358-361.
- Hampe A, Petit RJ (2005). Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matter. *Ecology Letters* 8: 461-467.
- Hemery G, Savill PS, Thakur A (2005). Height growth and flushing in common walnut (*Juglans regia* L.): 5-year results from provenance trials in Great Britain. *Forestry* 78: 121-133.
- Hengl T (2009). A practical guide to geostatistical mapping. University of Amsterdam, Amsterdam.
- Hewitt GM (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt GM (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Pleistocene. *Philos Trans R Soc London (Biol)* 359: 183-195.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG and Jarvis A (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.

- Holderegger R, Buehler D, Gugerli F, Manel S (2010). Landscape genetics of plants. *Cell* 15: 675-683.
- Houghton RA (1994). The worldwide extent of land use-change. *Bioscience* 44:305-13.
- Houghton RA, Lawrence KT, Hackler JL & Brown S (2001). The spatial distribution of forest biomass in the Brazilian Amazon: A comparison of estimates. *Global Change Biology*, 7(7): 731–746.
- Huntley B, Birks HJB (1983). An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 Years Ago. Cambridge University Press, NY, 238-242.
- Iacumin P, Bernini L, Boschetti T (2009). Climatic factors influencing the isotope composition of Italian olive oils and geographic characterisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 448-454.
- IBGE (2010). Synopsis of the 2010 population Census.
- INPE (2000). Monitoramento da floresta Amazonica Brasileira por satélite 1998– 1999. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (22 pp.).
- INPE (2003). Monitoramento da floresta Amazonica Brasileira por satélite 1999– 2001, www.dpi.inpe.br/prodesdigital, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.
- INPE (2008). Monitoramento da cobertura florestal da amazônia por satélites. Sistemas PRODES, DETER, DEGRAD e QUEIMADAS 2007-2008.
- Jakobsson M & Rosenberg NA (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 14: 1801-1806.
- Jin L, Chen F, Morrill C, Otto-Bliesner BL, Rosenbloom N (2012). Causes of early Holocene desertification in arid central Asia. *Clim Dyn* 38: 1577-1591.
- Kalinowski ST (2004). Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv Genet* 5: 539-543.
- Karimi R, Ershadi A, Vahdati K, Woeste K (2010). Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellites markers. *Hort Science* 45: 1403-1406.
- Kolov O (1998). Ecological characteristics of the walnut-fruit forests of southern Kyrgyzstan. In: Blaser J, Carter J, Gilmour D, editors. *Biodiversity and Sustainable Use of Kyrgyzstan's Walnut-Fruit Forests*. English version. IUCN, Intercooperation, Gland, Cambridge, Bern. pp. 59–61.

- Krebs P, Conedera M, Pradella M, Torriani D, Felber M, Tinner W (2004). Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Veget Hist Archaeobot* 13: 145-160.
- Krige DG (1951). A statistical approach to some basic mine valuation problems on the Witwatersrand. *Journal of the Chemical, Metallurgical and Mining Society* 52: 119–139.
- Lang P, Dane F, Kubisiak TL, Huang H (2007). Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 49–59.
- Laurance WF, Nascimento HEM, Laurance SG, Andrade AC, Fearnside PM, Ribeiro JEL, Capretz RL (2006). Rain forest fragmentation and the proliferation of successional trees. *Ecology*, 87 (2): 469-482.
- Lei M, Wang Q, Wu ZJ, Lopez-Pujol J, Li DZ et al (2012). Molecular phylogeography of *Fagus engleriana* (Fagaceae) in subtropical China: limited admixture among multiple refugia. *Tree Genet Genomes* 8: 1203-1212.
- Leslie CA, McGranahan GH (1998). The origin of the walnut. In Ramos DE, editor. Walnut production manual: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3373. pp. 3-7.
- Lillesand TM, Kiefer RW (2000). Remote Sensing and Image Analysis 4th Edition, John Wiley and Sons, New York, 736 pp.
- Loacker K, Kofler W, Pagitz K, Oberhuber W (2006). Spread of walnut (*Juglans regia* L.) in an Alpine valley is correlated with climate warming. *Flora* 202: 70–78.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89: 238–247.
- Malvolti ME, Pollegioni P, Mapelli S, Cannata F (2010). Research of *Juglans regia* provenances by molecular, morphological and biochemical markers: a case study in Italy. *BBB* 4: 84–92.
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum Biol* 76: 173-190.
- Mannina L, Gobbino M, Mariani C, Bellan G, Alessandri V, Capitani D, Di Ferdinando S (2009). Fingerprint of olive oils from Lazio using a widespread analytical protocol. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. XXXVI, 15-23.

- Mannina L, Marini F, Gobbino M, Sobolev AP, Capitani D (2010). NMR and chemometrics in tracing European olive oils: the case study of Ligurian samples. *Talanta*, 80, 2141-2148.
- Mannina L, Patumi M, Proietti N, Bassi D, Segre AL (2001). Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high field ¹H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2687-2696
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Mapelli S, Vidanova GV (2011). Study of biodiversity and genetic resources of walnut in Uzbekistan. I: Western Tien-Shan forests. National Research Council, Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, Milan, Italy.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7: 639-655.
- Martín MA, Mattioni C, Molina JR, Alvarez JB, Cherubini M, et al. (2012). Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genet Genomes* 8: 127-136.
- Matheron G (1962). *Traité de géostatistique appliquée*. Vol. 14 of *Mémoires du Bureau de Recherches Géologiques et Minières*. Editions Technip, Paris, p. NA.
- Mattioni C, Cherubini M, Micheli E, Villani F, Bucci G (2008). Role of domestication in shaping *Castanea sativa* genetic variation in Europe. *Tree Genetics & Genomes* 4: 563-574.
- Mattioni C., Martin MA., Cherubini M., Turchini D., Villani F. (2010) Genetic diversity in European chestnut populations. *Acta Horticulturae* 866: 163-167
- Mattioni C, Martin A, Pollegioni P, Cherubini M, Villani F (2013). Microsatellite markers reveal a strong geographic structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): evidence for multiple glacial refugia. *Am J Bot* 100: 1-11.
- Médail F, Diadema K (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333- 1345.
- Mitchell A (1999). *The ESRI guide to GIS analysis, volume 1: geographic patterns and relationships*. ESRI, Redlands (CA).
- Mitchell A (2005). *The ESRI guide to GIS analysis, volume 2: spatial measurements and statistics*. ESRI, Redlands (CA).

- Molnar TJ, Zaurov DE, Capik JM, Eisenman SW, Ford T (2011). Persian walnuts (*Juglans regia* L.) in Central Asia. 101st Annual Report, September 2011. pp. 56-69.
- Morton DC, DeFries RS, Shimabukuro YE, Anderson LO, Arai E, Espirito-Santo FDB, Freitas R & Morisette J (2006). Cropland expansion changes deforestation dynamics in the southern Brazilian Amazon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 14 637–14 641. (doi:10.1073/pnas.0606377103).
- Mourik J van (1985). Pollen profiles of slope deposits in the Galician Area (N.W. Spain). Doctoral Thesis, University of Amsterdam.
- Murphy MA, Evans JS, Cushman SA, Storfer A (2008). Representing genetic variation as continuous surfaces: an approach for identifying spatial dependency in landscape genetic studies. *Ecography*, 31: 685-697.
- Myers N (1986). Tropical deforestation and a mega-extinction spasm. Pp. 394-409 in *Conservation Biology: The Science of Scarcity and diversity*. (Ed. ME Soulé). (Sinauer associates: Sunderland).
- Nepstad DC, Verissimo JA, Alencar A, Nobre C, Lima E, Lefebvre P, Schlesinger P, Potter C, Moutinho P, Mendoza E, Cochrane M & Brooks V (1999). Large-scale impoverishment of Amazonian forests by logging and fire. *International Weekly Journal of Science, Nature*, 398, 505–508.
- Pautasso M (2009). Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspect Plant Ecol* 11: 157–189.
- Peakall R & Smouse PE (2005). GenAlEx V6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/genAlEx/>.
- Petit RJ, Aguinagald I, de Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S et al. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Petit RJ, Brewer S, Bordac S, Burg K, Cheddadi R (2002). Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecol Manag* 156: 49-74.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in effective population size from allele frequency data. *J Hered* 90: 502-503.

- Pitte JR (1986). *Terres de Castanide. Homme et Paysage du Châtaignier de l'Antiquité à nos Jours*. Librairie A Fayard, Paris.
- Pollegioni P, Woeste K, Olimpieri I, Marandola D, Cannata F, Malvolti ME, (2011). Long term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR markers. *Tree Genet Genomes* 7: 707-723.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Qian H & Ricklefs RE (2000). Large-scale processes and the Asian bias in species diversity of temperate plants. *Nature* 407: 180-182.
- Qiu YX, Fu CX, Comes HP (2011). Plant molecular phytogeography in China and adjacent regions: tracing the genetic imprints of Quaternary climate and environmental change in the world's most diverse temperate flora. *Mol Phylogenet Evol* 59: 225-244.
- Raspa G (1995). *Dispense di geostatistica per il corso di Laurea Specialistica in Ingegneria per l'Ambiente ed il Territorio*, Roma. <http://w3.uniroma1.it/geostatistica/Geostatistica/Geostatistica.htm>
- Reis A, Bechara FC, Tres DR (2010). Nucleation in tropical ecological restoration. *Scientia Agricola*, 67 (2): 244-250.
- Ricketts RD, Johson TC, Brown ET, Rasmussen KA, Romanovsky VV (2001). The Holocene paleolimnology of Lake Issyk-kKul, Kyrgyzstan: trace element and stable isotope composition of ostracodes. *Palaeogeogr Palaeoclimatol* 176: 207-227.
- Roberts DA, Keller M, Viane Soares J (2007). Studies of land-cover, land-use, and biophysical properties of vegetation in the Large Scale Biosphere Atmosphere experiment in Amazonia. *Remote Sensing of Environment*, 87: 377–388.
- Rodrigues RR, Lima RAF, Gandolfi S, Nave AG (2009). On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142: 1242-1251.
- Rong-Ting X (1990). Discussion on the origin of walnut in China. *Acta Hort* 284: 353–361.
- Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4: 137-138.

- Ruiz-Garcia L, Lopez-Ortega G, Fuentes Denia A, Tomas DF (2011). Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and evaluation of their genetic variability by microsatellite markers. INIA, Spanish Journal of Agricultural Research, 9 (1), 179-192.
- Salas-Salvadó J, Casa-Agustench P, Sala-Huetos A (2011). Cultural and historical aspects of Mediterranean nuts with emphasis on their attributed healthy and nutritional properties. Nutr Metab Cardiovas 21: S1-S6.
- Santos L, Vidal Romani JR, Jalut G (2000). History of vegetation during the Holocene in the Courel and Queixa Sierra, Galicia, northwest iberian Peninsula. Journal of Quaternary Science 15: 621-632.
- Schlawin JR & Zahawi RA (2008). “Nucleating” succession in recovering neotropical wet forests: The legacy of remnant trees. Journal of vegetation Science, 19: 485-492.
- Schmidt M, Doerre A (2011). Changing meanings of Kyrgyzstan’s nut forests from colonial to post-Soviet times. Area 43.3: 288-296.
- Schroder B., Seppelt R. (2006). Analysis of pattern–process interactions based on landscape models—Overview, general concepts, and methodological issues. Ecological Modelling 199 (505-516).
- Silva MPS, Câmara G, Escada MIS, Souza RCM (2008). Remote-sensing image mining: detecting agents of land-use change in tropical forest areas. International Journal of Remote Sensing, 29, 16: 4803-4822.
- Smouse PE, Long JC, Sokal RR (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. Syst Zool 35: 627-632.
- Souza C Jr, Firestone L, Moreira Silva L, Roberts D (2003). Mapping forest degradation in the Eastern Amazon from SPOT 4 through spectral mixture models. Remote Sensing of Environment 87: 494–506.
- Spear SF, Storfer A (2008). Landscape genetic structure of coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in protected vs. managed forests. Mol Ecol 17: 4642-4656.
- Storfer A, Murphy MA, Spear SF, Holderegger R, Waits LP (2010). Landscape genetics: where are we now? Mol Ecol 19: 3496-3514.

- Takezaki N, Nei M, Tamura K (2010). POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Mol Biol Evol* 27: 747-52.
- Tribsch A & Schönswetter P (2003). Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeoenvironmental evidence for Pleistocene refugia in the eastern Alps. *Taxon* 52: 477–497.
- Tzedakis JD. (2009) Cenozoic climate and vegetation change in the Mediterranean basin. In: *The Physical Geography of the Mediterranean*. Woodward JC. (Ed.), Oxford University Press, Oxford
- Uhl C, Bushbacher R, Serrao EA (1988). Abandoned pastures in eastern Amazonia. Patterns of plant succession. *Journal of Ecology*, 76: 663-681.
- Victory E, Glaubitz JC, Rhodes OE, Woeste K. (2006). Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. *Am J Bot* 93: 118- 126.
- Villani F, Sansotta A, Cherubini M, Cesaroni D, Sbordoni V (1999). Genetic structure of natural population of *Castanea sativa* in Turkey: evidence of a hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 233-244
- Walker RT & Homma A (1993). Land use and land cover dynamics in the Brazilian Amazon: an overview. *Ecological Economics*, 18:67-80.
- Walker RT & Smith TE (1993). Tropical deforestation and forest management under the system of concession logging: a decision-theoretic analysis. *Journal of Regional Science*, 33(3): 387-419.
- Wang H, Pei D, Gu R, Wang B (2008). Genetic diversity and structure of walnut populations in central and south-western China revealed by microsatellite markers. *J Amer Soc Hort Sci* 133: 197-203.
- Webster R & Oliver MA (2001). *Geostatistics for Environmental Scientists*. Statistics in Practice. Wiley, Chichester, p. 265.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP (eds.) (2010). *ISOSCAPES*. Understanding movement, pattern, and process on Earth through isotope mapping. DOI 10.1007/978-90-481-3354-3_20. Springer Science + Business Media B.V. 2010.

Widmer A & Lexer C (2001). Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends Ecol Evol* 16: 267-269.

Woeste K, Michler C (2011). *Juglans*. In: Kole C editor. Wild crop relatives: genomic and breeding resources, forest trees. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. pp. 77–87.

Wright SJ (2005). Tropical forests in a changing environment. *Trends in Ecology and Evolution*, 20 (10): 553-560.

WWF e IBAMA. <http://www.nationalgeographic.com/wildworld/profiles/terrestrial/nt>

Yeh FC, Yang R-C, Boyle TJB, Ye Z-H, Mao JX (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Young TP, Petersen DA, Clary JJ (2005). The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. *Ecology Letters*, 8: 662-673.

Ringraziamenti

Questa tesi di dottorato è frutto delle attività di ricerca che ho svolto presso l'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR, sede di Porano, in qualità di assegnista di ricerca.

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato in questi tre anni di attività. Ringrazio il mio tutore Prof.ssa Maria Nicolina Ripa. In particolare ringrazio il mio co-tutore Dott. Marco Lauteri che mi ha dato la possibilità di arrivare a questo risultato.

Il Dott. Enrico Brugnoli, Direttore dell'IBAF quando cominciai le attività, e il Dott. Angelo Massacci, attuale Direttore dell'IBAF.

Il Dott. Andrea Pisanelli con il quale ho collaborato nel corso delle attività relative al primo caso di studio.

La Dott.ssa Fiorella Villani e la Dott.ssa Mimì Malvolti responsabili delle collezioni di dati genetici analizzati nel secondo e terzo caso di studio e delle relative linee di ricerca.

La Dott.ssa Paola Pollegioni, la Dott.ssa Claudia Mattioni e la Dott.ssa Irene Olimpieri con le quali ho collaborato attivamente e che mi hanno aiutato a intraprendere un nuovo percorso di ricerca nel mondo della landscape genetics.

La Dott.ssa Silvia Portarena con la quale ho collaborato nel quarto caso di studio.

La Dott.ssa Ilaria Lusini e la Dott.ssa Virginia Tortolano con le quali ho condiviso parte delle attività di ricerca.

Ringrazio Simona per essermi stata vicina e Giovanni per la sua disponibilità.

Infine ringrazio mio marito Marco e i miei figli Costanza, Claudia, Camilla e Filippo per essermi sempre vicini.

Allegato 1

Lista di 76 siti geografici di polline fossile (Asia, Medio e Vicino Oriente). Sono indicate le coordinate geografiche, l'altitudine e la datazione con radiocarbonio.

Country	Site name	Latitude	Longitude	Elevation (m)	Age cal. yr BP	References
Kyrgyzstan	Ak Terek	40°27'00"N	72°45'00"E	1748	7500	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636.
	Nizhnee Lake	41°18'00"N	72°57'00"E	1371	1560	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636
	Verkhnee Lake	41°18'00"N	72°50'00"E	1440	1600	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636
	Ortok Lake	41°14'00"N	73°15'00"E	1786	850	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636
	Kosh Sas	41°51'00"N	71°58'00"E	1786	3700	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636
	Bakaly Lake	41°52'00"N	71°58'00"E	1879	6800	Beer et al. (2008) Vegetation history of the walnut forests in Kyrgyzstan (Central Asia): natural or anthropogenic origin <i>Quaternary Science Reviews</i> 27: 621-636
	Kichikol Lake	39°59'00"N	73°33'00"E	2541	1930	Beer et al. (2007) Vegetation history, fire history and lake development recorded for 6300 years by pollen, charcoal, loss on ignition and chironomids at a small lake in southern Kyrgyzstan (Alay Range, Central Asia). <i>The Holocene</i> 17: 977-985.
Kazakhstan	Chernyshov Bay	45°58'52"N	59°14'45"E	53	1450	Sorrel et al. (2007) Climate variability in the Aral Sea basin (Central Asia) during the late Holocene based on vegetation changes. <i>Quaternary Research</i> 67:357-370

Pakistan	Shukan	36°23'00"N	73°07'00"E	3360	5748	Miehe et al. (2009) Early human impact in the forest ecotone of southern High Asia (Hindu Kush, Himalaya). <i>Quaternary research</i> 71: 255-265.
Nepal	Thulo Pokhari	27°41'00"N	87°43'00"E	3980	11.000	Yonebayashi et al. (1997) Late Quaternary vegetation and climatic history of eastern Nepal. <i>Journal of Biogeography</i> 24: 837-843.
	Lake Rukche	28°17'74"N	84°46'55"E	3500	17.897	Schlüts & Zech (2004) Palynological investigations on vegetation and climate change in the late Quaternary of Lake Rukche, Gorkha Himal, Central Nepal. <i>Vegetation History and Archaeobotany</i> 13: 81-90
India	Lake Tso Kar	33°10'00"N	78°00'00"E	4527	15.000	Demske et al. (2009) Late glacial and Holocene vegetation, Indian monsoon and westerly circulation in the Trans-Himalaya recorded in the lacustrine pollen sequence from Tso Kar, Ladakh, NW India. <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 279: 172-185
	Dokriani Valley	30°48'00"N	78°40'00"E	3763	12.406	Bhattacharyya et al. (2011) Vegetation vis-à-vis climate and glacier history during 12,400 to 5,400 yr BP from Dokriani valley, Garhwal Himalaya, India. <i>Journal geological society of India</i> 77:401-408.
	Butapathri Lake	34°04'30"N	74°18'30"E	3000	17.000	Kusumgar et al. (1986) Palaeosols within loess: dating palaeoclimatic events in Kashmir. <i>Radiocarbon</i> 28:561-565.
	Surinsar Lake	32°45'00"N	75°02'00"E	637	8200	Trivedi & Chauhan (2009) Holocene vegetation and climate fluctuations in Northwest Himalaya, based on pollen evidence from Surinsar lake, Jammu region, India. <i>Journal Geological Society of India</i> 74:402-412.
	Bhimtal-Naukuchiatal Lake	29°20'00"N	79°35'00"E	1219	30.000	Kotlia et al. (1997) Palaeoclimatic conditions in the upper Pleistocene and Holocene Bhimtal-Naukuchiatal Lake basin in south-central Kumaun, North India. <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 130: 307-322.
	Wadda Lake	29°33'30"N	80°17'30"E	1500	30.080	Kotlia et al. (2000) Palaeoclimatic conditions in the late Pleistocene Wadda Lake, eastern Kumaun Himalaya (India). <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 162:105-118
Tajikistan	Kuruksai	38°06'00"N	69°01'00"E	2972	11.700	Dodonov & Baiguzina (1995) Loess stratigraphy of central Asia: palaeoclimatic and palaeoenvironmental aspects. <i>Quaternary Science Reviews</i> 14: 707-720

China	Darai Kalon	37°54'43"N	69°46'51"E	2000	11.700	Dodonov et al. (2006) Multidisciplinary approach for paleoenvironmental reconstruction in loess-paleosol studies of the Darai Kalon section, Southern Tajikistan. <i>Quaternary International</i> 152-153:48-58.
	Huguangyan Maar Lake	21°09'00"N	110°17'0"E	23	11.600	ShuYun et al. (2007) The early Holocene optimum inferred from a high-resolution pollen records of Huguangyan maar Lake in southern China. <i>Chinese Science Bulletin</i> 52: 2829-2836.
	Jingou River	44°10'00"N	85°27'04"E	900	~ 23 Ma	Tang et al. (2011) Late Cenozoic central Asian drying inferred from a plynological record from the northern Tian Shan. <i>Earth and Planetary Science Letters</i> 302: 439-447.
	Taxihe River	44°09'00"N	86°20'00"E	1000	~ 23 Ma	Sun & Zhang (2008) Palynological evidence for the Mid-Miocene climatic optimum recorded in Cenozoic sediments of the Tian Shan Range, north western China. <i>Global and Planetary Change</i> 64: 53-68.
	Lhasa	29°10'00"N	91°04'00"E	3648	600	Miehe et al. (2006) Palaeoecological and experimental evidence of former forests and woodlands in the treeless desert pastures of Southern Tibet (Lhasa, A.R. Xizang, China). <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 242: 54-67.
	Qaidam Basin	38°22'47.8"N	91°44'53.43"E	2736	3.1 Ma	Cai et al. (2012). Pliocene-Pleistocene stepwise drying of Central Asia: evidence from paleomagnetism and sporopollen record of the deep borehole SG-3 in the western Qaidam basin, NE Tibetan plateau. <i>Global and Planetary Change</i> 94-95:72-81.
	Sumxi Lake	34°30'00"N	80°15'00"E	5058	12.700	Van Campo (1993) Pollen- and diatom-inferred climatic and hydrological changes in Sumxi Co Basin (Western Tibet) since 13,000 yr B.P. <i>Quaternary Research</i> 39: 300-313.
	Erhai Lake	25°58'00"N	100°18'00"E	1974	8800	Yang X et al. (2005) Pollen evidence of early human activities in Erhai basin, Yunnan Province. <i>Chinese Science Bulletin</i> 6: 569-577.
	Erhai Lake	25°36'00"N	100°05'00"E	1974	12.950	Shen et al. (2005) Lake sediment records on climate change and human activities since the Holocene in Erhai catchment, Yunnan Province, China. <i>Science in China Ser. D Earth Sciences</i> 3: 353-363.
	Anyang	36°5'4"N	114°24'05"E	67	11.500	Cao et al. (2010.) Holocene climate change and human impacts implied from the pollen records in Anyang, central China.

Dajiuhu	31°29'08"N	110°00'07"E	1751	40.000	Li et al. (2012) Vegetation changes during the past 40,000 years in Central China from a long fossil record. <i>Quaternary International</i> do:10.1016/j.quaint.2012.01.009
Dajiuhu	31°29'27"N	109°59'45"E	1760	13.000	Zhu et al. (2006) Pollen record from Dajiuhu Basin of Shennongjia and environmental changes since 15.753 kaB.P. <i>Quaternary Science</i> 5:841-826
Dadiwan	35°00'47"N	105°54'53"E	1400	9000	An et al. (2003).Evidence of a humid mid-Holocene in the western part of Chinese Loess Plateau. <i>Chinese Science Bulletin</i> 48:2472-2479
Sujiawan	35°32'20"N	104°31'22"E	1700	10.000	An et al. (2003) Evidence of a humid mid-Holocene in the western part of Chinese Loess Plateau. <i>Chinese Science Bulletin</i> 48:2472-2479
Jinchuan	42°20'00"N	126°26'00"E	662	10.800	Jiang et al. (2008) Natural and anthropogenic forest fires recorded in the Holocene pollen record from a Jinchuan peat bog, northeastern China. <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 261:47-57
Sihailongwan Lake	42°17'00"N	126°36'00"E	791	11.200	Stebich et al. (2009) Late Pleistocene spread of (cool-)temperate forests in Northeast China and climate changes synchronous with the North Atlantic region. <i>Global and Planetary Change</i> 65: 56-70
Yellow River Delta	37°40.5'02"N	118°28.7'00"E	5.5	3365	Yi et al. (2003) Holocene environmental history inferred from pollen assemblages in the Huanghe (Yellow River) delta, China: climatic change and human impact. <i>Quaternary Science Reviews</i> 22:609-628
Yellow River Delta	37°47.8'02"N	118°54.3'00"E	4.9	12.500	Yi et al. (2003). Holocene environmental history inferred from pollen assemblages in the Huanghe (Yellow River) delta, China: climatic change and human impact. <i>Quaternary Science Reviews</i> 22:609-628
Taishizhuang	40°21.5'00"N	115°49.5'00"E	500	5500	Tarasov et al. (2006) Mid-Holocene environmental and human dynamics in northeastern China reconstructed from pollen and archaeological data. <i>Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology</i> 241:284-300
Bayanchagan	41°65'00"N	115°21'00"E	1355	11.100	Jiang et al. (2006) Reconstruction of climate and vegetation changes of Lake Bayanchagan (Inner Mongolia): Holocene variability of the

East Asian monsoon. *Quaternary research* 65: 411-420

	Diaojiao lake	41°18'00"N	112°21'00"E	1800	10.175	Shi & Song (2003) Palynological records of environmental changes in the middle part of Inner Mongolia, China. <i>Chinese Science Bulletin</i> 48:1433-1438
	Yangtze River	32°15'00"N	120°14'00"E	5.91	11.735	Yi et al. (2004) Latest pleistocene climate variation of the East Asian monsoon from pollen records of two East China region. <i>Quaternary International</i> 121:75-87
	Yangtze River	32°37'00"N	120°23'00"E	2.48	12.940	Yi et al. (2004) Latest pleistocene climate variation of the East Asian monsoon from pollen records of two East China region. <i>Quaternary International</i> 121:75-87
	Chao Lake	31°31'47.1"N	117°22'29.8"E	20	9260	Chen et al. (2009) Holocene vegetation history with implications of human impact in the Lake Chaohu area, Anhui Providence, East China. <i>Veget Hist Archaeobot</i> 18:137-146
	Poyang Lake	28°52'00"N	116°15'00"E	14.1	10.240	Jiang & Piperno (1999) Environmental and Archaeological Implications of a late Quaternary Palynological Sequence, Poyang Lake, Southern China. <i>Quaternary Research</i> 52:250-258
Georgia	Gadachrili Gora	41°39'61"N	44°82'10"E	370	7600	Kvavadze et al. (2010) http://www.oiv2010.ge/POSTER/POST_OENOLOGY/P.II.21-No%20109%20P%20Kvavadze-Wine%20Congres.pdf
	Dzudzuana Cave	42°30'00"N	43°31'00"E	560	24.000	Bar-Yosef et al. (2011) Dzudzuana: an Upper Palaeolithic cave site in the Caucasus foothills (Georgia). <i>Antiquity</i> 85: 331-349.
	Dmanisi	41°19'00"N	44°21'00"E	1015	1.7 Ma	Messager et al. (2011) Palaeoenvironments of early hominins in temperate and Mediterranean Eurasia: new palaeobotanical data from Palaeolithic key-sites and synchronous natural sequences. <i>Quaternary Science Reviews</i> 30:1439-1447
	Lake Bazaleti	42° 2' 20.4"N	44° 40' 40.8"E	874	2570	Kvavadze & Connor, (2005) <i>Zelkova carpinifolia</i> (Pallas) K. Koch in Holocene sediments of Georgia- an indicator of climatic optima. <i>Review of Palaeobotany and Palynology</i> 133: 69-89
	Imera lake	41° 35' 29"N	44° 5' 13"E	1600	2360	Kvavadze & Connor, (2005). <i>Zelkova carpinifolia</i> (Pallas) K. Koch in Holocene sediments of Georgia- an indicator of climatic optima. <i>Review of Palaeobotany and Palynology</i> 133: 69-89

	Supsa River	42° 0' 33"N	41° 51' 37"E	30	1260	Kvavadze & Connor, (2005) <i>Zelkova carpinifolia</i> (Pallas) K. Koch in Holocene sediments of Georgia- an indicator of climatic optima. <i>Review of Palaeobotany and Palynology</i> 133: 69-89
	Akhali Ateni	43°00'00"N	40°59'00"E	0	6300	Kvavadze & Connor, (2005) <i>Zelkova carpinifolia</i> (Pallas) K. Koch in Holocene sediments of Georgia- an indicator of climatic optima. <i>Review of Palaeobotany and Palynology</i> 133: 69-89
	Ispani	41°51'47"N	41°48'40"E	0	1900	Connor et al. (2007) A 5600-yr history of changing vegetation, sea levels and human impacts from the Black Sea coast of Georgia. <i>The Holocene</i> 17:25-36
	Gagra	43°17'0"N	40°16'0"E	4	5754	Kvavadze (1982) The new data on the stratigraphy and palaeogeography of the Holocene of the Colchida lowland. Pages 123-130. <i>Quaternary system of Georgia</i> . Tbilisi, Metsniereba
	Adange	43°18'20"N	41°20'0" E	1750	3945	Kvavadze & Rukhadze (1989) Vegetation and climate of the Holocene of Abkhazia. Metsniereba, Tbilisi, Georgia, 138p
	Khodzal	42°57'15"N	41°54'40"E	2030	441	Kvavadze & Rukhadze (1989) Vegetation and climate of the Holocene of Abkhazia. Metsniereba, Tbilisi, Georgia, 138p
	Sibista	43°14'0"N	41°25'50"E	2160	1633	Kvavadze & Rukhadze (1989) Vegetation and climate of the Holocene of Abkhazia. Metsniereba, Tbilisi, Georgia, 138p
	Amtqel	43°16'5"N	41°18'30"E	1830	1612	Kvavadze et al. (1987) On the migration on high-mountain vegetation belts in the late Holocene in the valley of the Amtqel river (Abkazia). <i>Bulletin of the Georgian Academy of Sciences</i> 125(2):421-424.
Russia	Treugol'naya Cave	43°05'00"	41°00'00"E	1500	393.000	Doronichev (2000) Lower paleolithic occupation of the northern Caucasus. <i>Eraul</i> 92: 67-77
Iran	Lake Urmia	37°35'0"N	45°28'0"E	1265	1845	Bottema (1986) A late quaternary pollen diagram from lake urmia (Northwestern Iran). <i>Review of Paleobotany and Palynology</i> 47:241-261.
	Lake Zeribar	35°32'00"N	46°07'00"E	1288	3492	Sytze Bottema (http://www.europeanpollendatabase.net/data/)
	Lake Almalou	37°39'55"N	46°37'55"E	2491	2000	Djamali et al. (2009) A late Holocene pollen record from Lake Almalou in NW Iran: evidence for changing land-use in relation to some historical events during the last 3700 years. <i>Journal of</i>

	Lake Maharlou	29°30'00"N	52°50'00"E	1455	5300	Djamali et al. (2009) Vegetation history of the SE section of the Zagros Mountains during the last five millennia; a pollen record from the Maharlou Lake, Fars Province, Iran. <i>Veget Hist Archaeobot</i> 18:123-136
Iraq	Shanidar Cave	36°50'00"N	44°13'00"E	745	44.000	Henry et al. (2011) Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). <i>PNAS</i> 108: 486-491
Israel	Lake Kinneret	32°42'00"N	35°50'00"E	-209	2362	Baruch (1986) The Late Holocene Vegetational History of Lake Kinneret (Sea of Galilee), Israel. <i>Paléorient</i> 12:37-48
	Dead Sea-Ze'elim	31° 20'00"N	35° 30'00"E	-420	2344	Neumann et al. (2007) Palynology, sedimentology and palaeoecology of the late Holocene Dead Sea. <i>Quaternary Science Reviews</i> 26:1476-1498
Syria	Bouara	35°14'00"N	41°11'00"E	210	2990	Gremmen & Bottema (1991) Palynological investigations in the Syrian Gazira. Pages 105-116 in C. Becker et al, editors. Dietrich Reimer Verlag.
	Ghab Valley	35°39'00"N	36°15'00"E	240	5010	Yasuda et al. (2000) The earliest record of major anthropogenic deforestation in the Ghab Valley, northwest Syria: a palynological study. <i>Quaternary International</i> 73/74: 127-136
Turkey	Marmara Sea	40°50'00"N	26°00'00"E	1080	5000	Cordova et al. (2009) Pollen, plant macrofossil and charcoal records for palaeovegetation reconstruction in the Mediterranean-Black Sea Corridor since the Last Glacial Maximum. <i>Quaternary International</i> 197:12-26
	Lake Manyas	40°12'00"N	28°00'00"E	14	2500	Cordova et al. (2009) Pollen, plant macrofossil and charcoal records for palaeovegetation reconstruction in the Mediterranean-Black Sea Corridor since the Last Glacial Maximum. <i>Quaternary International</i> 197:12-26
	Beyşehir Gölü I	37°32'30" N	31°30'00"E	1120	3505	Sytze Bottema (http://www.europeanpollendatabase.net/data/)
	Kararmik Batakligi	38°25'30" N	30°48'0" E	1000	6186	Van Zeist, Woldring & Stapert (1975) Late quaternary vegetation and climate of southwestern Turkey. <i>Palaeohistoria</i> 17:53-144
	Söğüt Gölü	36°59'51"N	29°53'54"E	1400	2647	Van Zeist et al. (1975) Late quaternary vegetation and climate of

					southwestern Turkey. <i>Palaeohistoria</i> 17:53-144
Köycegiz Gölü	36°52'30"N	28°38'30"E	20	4306	Sytze Bottema (http://www.europeanpollendatabase.net/data/)
Lake Van	38°30'0"N	43°00'00"E	1645	8175	Van Zeist & Woldring. (1978) Review of Palaeobotany and Palynology 26:249-276.
Ova Gölü	36°16'00"N	29°18'00"E	20	3538	Sytze Bottema (http://www.europeanpollendatabase.net/data/)
Göhlisar Gölü	37°08'00"N	29°36'00"E	930	2600	Eastwood et al. (1999) Holocene environmental change in southwest Turkey: a palaeoecological record of lake and catchment-related changes. <i>Quaternary Science Reviews</i> 18:671-695
Sagalassos	37° 40' 41"N	30° 31' 10"E	1470	2200	Vermoere et al. (2001) Modern pollen studies in the territory of Sagalassos (Southwest Turkey) and their use in the interpretation of a Late Holocene pollen diagram. <i>Review of Palaeobotany and Palynology</i> 114:29-56