Report finale delle attività di ricerca del progetto QuBER

Diversità genetica in popolazioni italiane di quercia da sughero per lo studio dell'adattamento ai cambiamenti climatici

relativo alla convenzione tra la Fondazione AlberItalia e il Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) – Università della Tuscia per contributo di ricerca. Cod. QuBER_2024

Durata del progetto: 11 novembre 2024 – 30 novembre 2025 (prorogato al 31 marzo 2026)

Finanziamento Fondazione AlberItalia – Direttore Dott. Sergio Gallo

Soggetti istituzionali partecipanti al partenariato QuBER:

Università della Tuscia – Dipartimento per l'Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF), (Dipartimento capofila, Responsabile scientifico Prof. Maurizio Sabatti)

Università di Sassari – Dipartimento di Agraria

Università di Palermo – Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali

Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Bioscienze e BioRisorse (IBBR)

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Foreste e Legno (CREA)

Agenzia Forestale Regionale per lo sviluppo del territorio e dell'Ambiente della Sardegna (FORESTAS)

Agenzia Regionale per la Ricerca in Agricoltura – Regione Sardegna (AGRIS)

Vengono presentate di seguito le principali attività e i risultati ottenuti nell'ambito del progetto QuBER nel periodo novembre 2024 - marzo 2026.

1) Selezione delle popolazioni naturali italiane di sughera per lo studio della diversità genetica della specie

Le attività di selezione delle popolazioni naturali di sughera (*Quercus suber*) sono state avviate nei mesi di novembre -dicembre 2024 con l'obiettivo di una caratterizzazione climatica di tutto l'areale di distribuzione della specie in Italia. Inizialmente, si è provveduto a definire l'intera nicchia ecologica della sughera, utilizzando gli strati informativi geografici disponibili online sul portale EUFORGEN e rappresentanti, con buona approssimazione, l'areale naturale della specie in Europa. Successivamente, è stata evidenziata la caratterizzazione ecologica e le informazioni sulla distribuzione delle popolazioni naturali di sughera nella penisola italiana, prendendo in considerazione le quelle note e i punti inventariali INFC 2015. I due dataset sono stati sovrapposti e comparati al fine di delineare come le popolazioni italiane di sughera fossero distribuite, interamente o parzialmente, nella nicchia ecologica della specie (Fig. 1). Per ottenere questo risultato sono stati utilizzati i due indici climatici di riferimento: l'indice di aridità estiva (Summer Heat Moisture - SHM),

$$SHM = \frac{Tmedia\ del\ mese\ più\ caldo\ [°C]}{Precipitazioni\ tra\ Maggio\ e\ Settembre\ [mm]\cdot 10^{-3}} \quad (1)$$

e il grado di continentalità (Temperature Difference - TD)

$$TD = Tmedia\ del\ mese\ più\ caldo[°C] - Tmedia\ del\ mese\ più\ freddo[°C] \quad (2)$$

I dati climatici in serie storica sono stati ottenuti dal portale ClimateDT (https://climatedt.org) e mediati sulla normale climatica più recente (1991-2020). La selezione iniziale dei siti italiani da campionare ed analizzare geneticamente è stata fatta seguendo il criterio di massima rappresentatività ecologica, ovvero massimizzando la copertura dell'intera nicchia ecologica disponibile, bilanciando nello spazio, sia geografico che ecologico, la distribuzione delle unità campionarie rappresentate dai popolamenti italiani di sughera. Una volta ottenuto il dataset di riferimento, si è provveduto alla scelta definitiva delle popolazioni naturali di sughera da campionare (Tab. 1) sulla base di contatti locali, al fine di includere anche informazioni addizionali rispetto all'ecologia e riguardanti aspetti di conoscenza diretta di accessibilità dei luoghi.

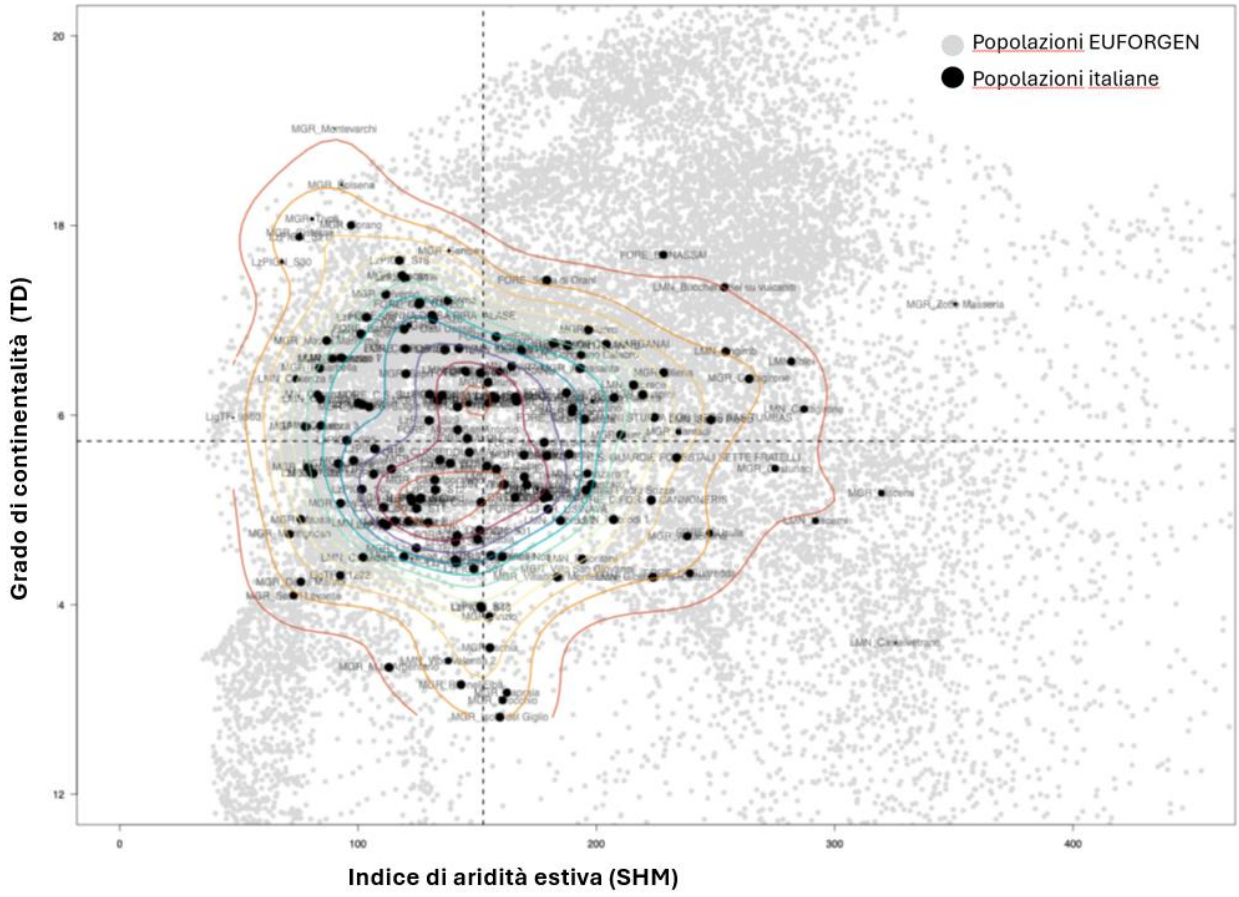

Fig. 1 - Caratterizzazione climatica di tutto l'areale di distribuzione della sughera in Italia (dati climatici derivati dal sistema di downscaling ClimateDT)

2) Attività di campionamento delle foglie nelle popolazioni italiane di sughera selezionate

Nel mese di Gennaio 2025 sono iniziate le attività di campionamento delle foglie su 40 popolazioni naturali di sughera (Tab. 1). I campioni fogliari per l'estrazione di DNA sono stati raccolti da 40 popolazioni italiane di sughera. L'area di raccolta comprende un gradiente latitudinale di circa 7 gradi (37.09 – 44.25) e uno longitudinale di circa 9 gradi (8.37 – 17.91). L'area di raccolta delle 40 popolazioni naturali di sughera campionate comprende 10 diverse regioni di provenienza (D.M. 269708/2021), 6 lungo la penisola e 4 nelle isole. Interessante notare che circa 1/3 delle popolazioni campionate sono localizzate a quote intorno ai 600-700 m di altezza sul livello del mare. La popolazione di sughera n. 38 (PIE – Loc. Pietratonda, Civitella Paganico (GR) è stata inclusa in quanto caratterizzata nell'ambito del progetto europeo DRYAD. La raccolta è stata completata dai partner del progetto nel mese di luglio 2025. Le foglie raccolte secondo un protocollo sperimentale condiviso tra i partner (Allegato 1) sono state utilizzate per l'estrazione del DNA da parte del CNR-IBBR di Firenze.

Tab. 1 - Elenco delle popolazioni naturali italiane di sughera (*Quercus suber*) selezionate per la raccolta delle foglie e per le analisi genetiche nell'ambito del progetto QuBER.

N. progr.	Cod. pop.	Località	Partner	N. campioni	Latitudine	Longitudine	Altitudine
1	GDG	Giara di Gesturi (VS)	AGRIS	20	39.75524	8.970064	585
2	CUS	Cusseddu (SS)	AGRIS	20	40.91441	9.131333	458
3	SUS	S'usula (OT)	AGRIS	20	40.86625	9.539522	18
4	LIT	Sos Lithos (NU)	AGRIS	20	40.6599	9.4309	357
5	TUS	Tuscania (VT)	CNR	25	42.42386	11.90672	191
6	MIR	Miranda (TR)	CNR	29	42.54012	12.69705	559
7	SIR	Tivoli (Roma)	CREA_UNITUS	20	41.96464	12.81463	440
8	STR	Boschi di Santa Teresa (BR)	CNR_UNITUS	20	40.54039	17.91781	59
9	PRE	Bosco Preti (BR)	CNR_UNITUS	20	40.56757	17.88502	52
10	MAR	Marganai (CI)	AGRIS	20	39.35045	8.56966	694
11	MON	Montresta (OR)	AGRIS	20	40.382467	8.510418	452
12	NEO	Neoneli-Assai (OR)	AGRIS	20	40.085691	9.021844	678
13	BON	Bonassai (SS)	AGRIS	20	40.679902	8.370523	37
14	INS	Insugherata (Roma)	CREA_UNITUS	20	41.9607	12.4337	95
15	CPZ	Castelporziano (Roma)	CNR_UNITUS	20	41.76402	12.39828	82
16	SVT	Monte San Biagio (LT)	CREA_UNITUS	20	41.37509	13.32709	120
17	GIA	Gianola (LT)	CREA_UNITUS	20	41.25138	13.67605	20
18	LAF	La Farnesiana (Roma)	CREA_UNITUS	20	42.18118	11.87047	241
19	TOR	Tor Caldara (Roma)	CREA_UNITUS	20	41.49144	12.59407	25
20	NIS	Niscemi (CL)	UNIPA	20	37.098825	14.420886	174
21	CAS	Castelvetrano (TP)	UNIPA	18	37.61526	12.765386	47
22	BUC	Buccheri (SR)	UNIPA	20	37.183545	14.87729	404
23	GAN	Ganzaria (CT)	UNIPA	20	37.255643	14.416301	625
24	FIC	Ficuzza (PA)	UNIPA	20	37.888595	13.36522	633
25	TRI	Tripi (ME)	UNIPA	18	38.087696	15.062961	464
26	COL	Collesano (PA)	UNIPA	20	37.921388	13.957331	644
27	BUP	Scorace (TP)	UNIPA	20	37.982385	12.775325	511
28	CAR	Caronia (ME)	UNIPA	18	37.995324	14.465727	613
29	MPI	Monte Pisano (PI)	CNR	16	43.73228	10.5006	97
30	DVM	Deiva Marina (SP)	CNR	17	44.22656	9.52853	75
31	CAN	Canolo (RC)	SAAF-UNIPA	16	38.295459	16.190701	623
32	PIZ	Pizzo (VV)	SAAF-UNIPA	20	38.760174	16.213612	237
33	PET	Petrizzi (CZ)	SAAF-UNIPA	19	38.699555	16.513076	86
34	SER	Serrastretta (CZ)	SAAF-UNIPA	20	38.94761	16.435684	375
35	SCA	San Cosmo Albanese (CS)	SAAF-UNIPA	20	39.580847	16.404709	337
36	CET	Cetraro (CS)	SAAF-UNIPA	20	39.547186	15.911107	401
37	BER	Bergeggi (SV)	CNR	16	44.254153	8.44446	213
38	PIE	Pietratonda (GR)	CNR_UNITUS	16	42.93304	11.185406	194
39	AVC	Ispani (SA)	Elisa Altomonte	16	40.086087	15.548521	270
40	ALB	Vibonati (SA)	Elisa Altomonte	16	40.110964	15.598682	203

3) Analisi genomiche attraverso l'impiego della tecnologia SPET

Il DNA estratto dai campioni di foglie raccolti nelle 40 popolazioni italiane di sughera è stato inviato per il sequenziamento presso l'azienda IGATECH ad Udine. La tecnologia impiegata, Single Primer Enrichment Technology (SPET), rappresenta uno degli approcci di *genotyping-by-*

sequencing (GBS) più promettenti e sempre più utilizzato per caratterizzare la diversità genetica delle specie forestali (Pinosio et al. 2026). Questa tecnologia utilizza un singolo *primer* per arricchire selettivamente regioni specifiche del genoma, consentendo una genotipizzazione mirata con costi di sequenziamento ridotti (Scaglione et al. 2018). La tecnologia SPET individua in modo efficiente i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) di interesse (SNP target), producendo al contempo centinaia di migliaia di siti variabili nelle sequenze fiancheggianti (SNP *de novo*). La lunghezza del sequenziamento può essere regolata in base alla necessità di rilevare SNP *de novo* o di concentrarsi su una genotipizzazione di SNP target economicamente vantaggiosa, con la possibilità di includere regioni del genoma distribuite in modo casuale che garantiscano la generazione di marcatori privi di *ascertainment bias*.

Le performance attese dall'impiego dell'analisi SPET nelle popolazioni italiane di sughera, in base alle performance mostrate nelle analisi del progetto FORGENIUS (Pinosio et al. 2026), è sintetizzata di seguito:

- 50% sonde su regioni target, 50% su regioni random
- 71467 marcatori SNP trovati a scala europea
- Elevata profondità di sequenziamento (>50x)
- Ottima copertura del genoma di riferimento (*Q. ilex*), 2,52 Mb sequenziate

4) Risultati delle analisi genomiche per le popolazioni italiane di sughera

I risultati dell'analisi preliminare bioinformatica hanno mostrato un'ottima qualità dei dati prodotti in tutte le 7 piastre assemblate, come si evince chiaramente dalla Tabella 2.

Tab. 2 - Risultati del test qualitativo eseguito sui dati grezzi ottenuti dal sequenziamento delle popolazioni italiane di sughera.

Plate ID	Sequenze per campione	% sequenze allineate	Copertura media
QUBER01	3,477,577	82.3%	53.1
QUBER02	5,679,768	86.5%	70.2
QUBER03	3,720,632	84.0%	63.0
QUBER04	1,344,166	88.0%	41.8
QUBER05	1,584,620	86.1%	55.4
QUBER06	1,443,587	86.1%	42.2
QUBER07	1,443,200	82.4%	49.6

Dopo il *Quality Control* (QC) dei dati grezzi ottenuti, finalizzato principalmente ad eliminare individui e marcatori che potrebbero introdurre distorsioni nei risultati a causa di un interazione non ottimale tra qualità del DNA e tecnologia di sequenziamento utilizzata, sono stati scartati 35 individui dalle 39 popolazioni campionate nell'ambito del progetto QUBER, e 14 individui da una popolazione precedentemente caratterizzata nel progetto FORGENIUS. Il numero esiguo di individui scartati riflette l'elevata qualità dei dati ottenuti (Fig. 3).

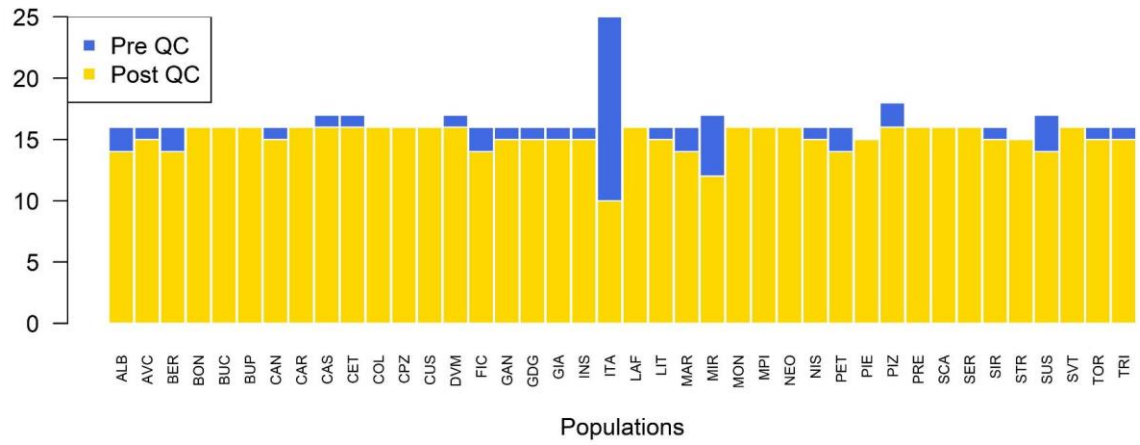

Fig. 3 – Individui di sughera mantenuti (in giallo) dopo il Quality Control dei dati. In blu sono indicati gli individui scartati.

Sul *dataset* finale è stata condotta una prima analisi per esplorare come la diversità genetica delle popolazioni di sughera sia strutturata spazialmente nel territorio italiano. Tale strutturazione è stata valutata utilizzando il *software* sNMF implementato nel pacchetto R *LEA* (Frichot e Francois 2015). Tale *software* stima il numero più probabile di popolazioni ancestrali (K) in grado di spiegare la distribuzione osservata della diversità genetica.

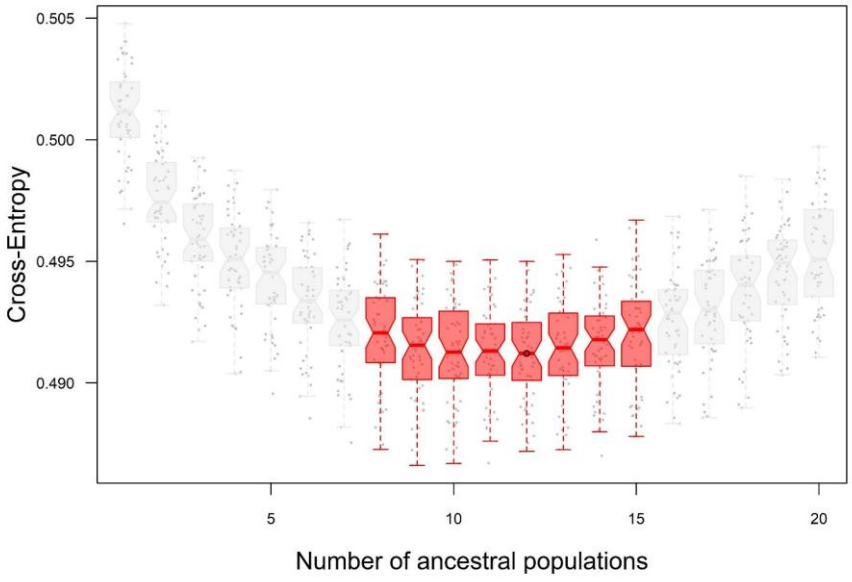

Fig. 4 – Distribuzione dei valori di cross-entropy calcolati per le popolazioni italiane di sughera

L'analisi è stata effettuata assumendo da un minimo di 1 ad un massimo di 20 popolazioni ancestrali, con 50 repliche per ogni valore di K. Per ogni replica è stato quantificato l'errore statistico, mediante il calcolo del parametro di *cross-entropy*, ottenendo la distribuzione degli errori per ogni valore di K assunto (Fig. 4). Il valore più probabile di K è quello associato al valore

mediano di *cross-entropy* minore e non statisticamente diverso dai successivi, che nel caso delle popolazioni di sughera analizzate è risultato essere otto.

Questo risultato supporta l'ipotesi di una forte strutturazione delle popolazioni di sughera in Italia, a partire da una suddivisione gerarchicamente superiore in due gruppi (K = 2) separati grossolanamente dalla regione Campania. Aumentando i livelli di strutturazione si separano prima le popolazioni pugliesi (a K=3), poi quelle liguri (a K = 4), quelle cilentane (a K = 5) e via via quelle più marginali (Fig. 5).

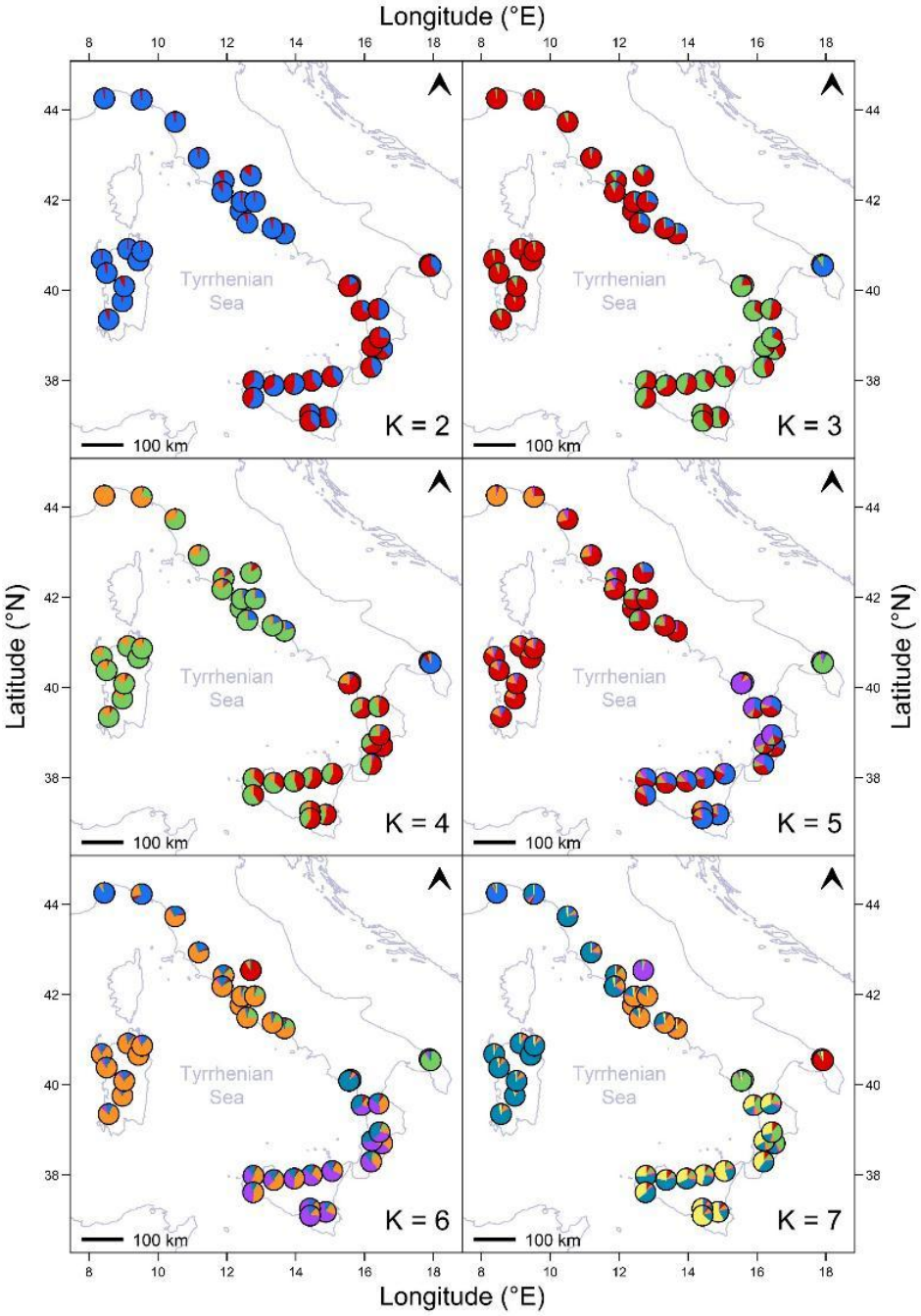

Figura 5 – Assegnazioni individuali mediate a livello di popolazione per i cluster genetici ricostruiti da K = 2 a K = 7.

La struttura trovata a K = 8 mostra numerose popolazioni marginali differenziate da quelle limitrofe (come nel caso delle popolazioni liguri, umbre, pugliesi e cilentane), che formano singoli gruppi genetici poco rappresentati altrove (ad eccezione della componente cilentana presente nel nord della Calabria, in blu in Fig. 6) e 3 gruppi principali, più diffusi, presenti tra: 1) Sardegna e la costa tirrenica tra Toscana e Lazio (in arancione in Fig. 6), 2) Lazio e Maremma (in viola) e 3) Calabria e Sicilia (in verde). Interessante notare come esistano zone di marcata commistione tra questi gruppi genetici principali, come la costa settentrionale della Sicilia (arancione-verde), e zone di graduale passaggio tra un gruppo genetico e l'altro (come in alcune zone del Lazio).

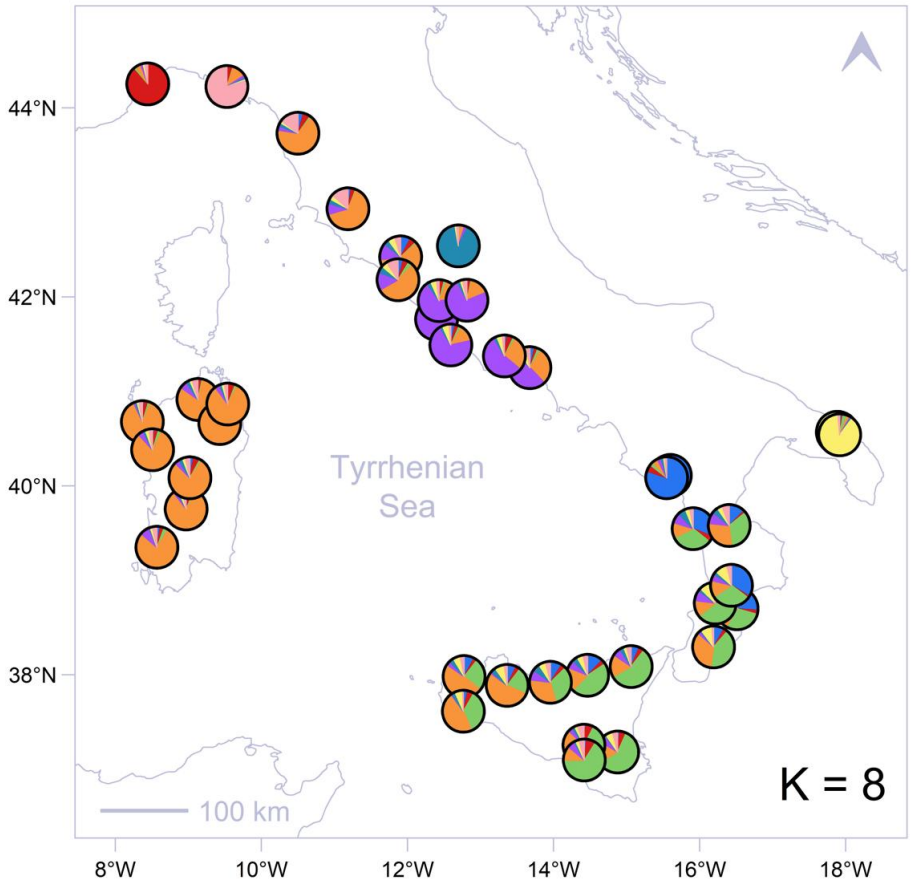

Fig. 6 - Struttura genetica più probabile delle popolazioni naturali italiane di sughera (*Quercus suber*) selezionate nell'ambito del progetto QuBER.

I valori di differenziazione genetica tra coppie di popolazioni, quantificati con PLINK tramite la stima dell'indice di fissazione di Hudson (Hudson et al. 1992; Bhatia et al. 2013) sembrano confermare la gerarchia appena descritta nella struttura genetica delle popolazioni, con una forte permeabilità al flusso genico tra i gruppi della costa ionica a sud della Toscana, e maggiore isolamento nelle popolazioni più marginali (Fig. 7). L'intervallo di variazione di questo parametro è molto piccolo, da un minimo di 0.18 ad un massimo di 0.20, indicando che le

popolazioni analizzate hanno livelli di diversità genetica simili, e che non è in corso nessun particolare fenomeno di erosione della diversità genetica in porzioni specifiche dell'areale italiano della specie.

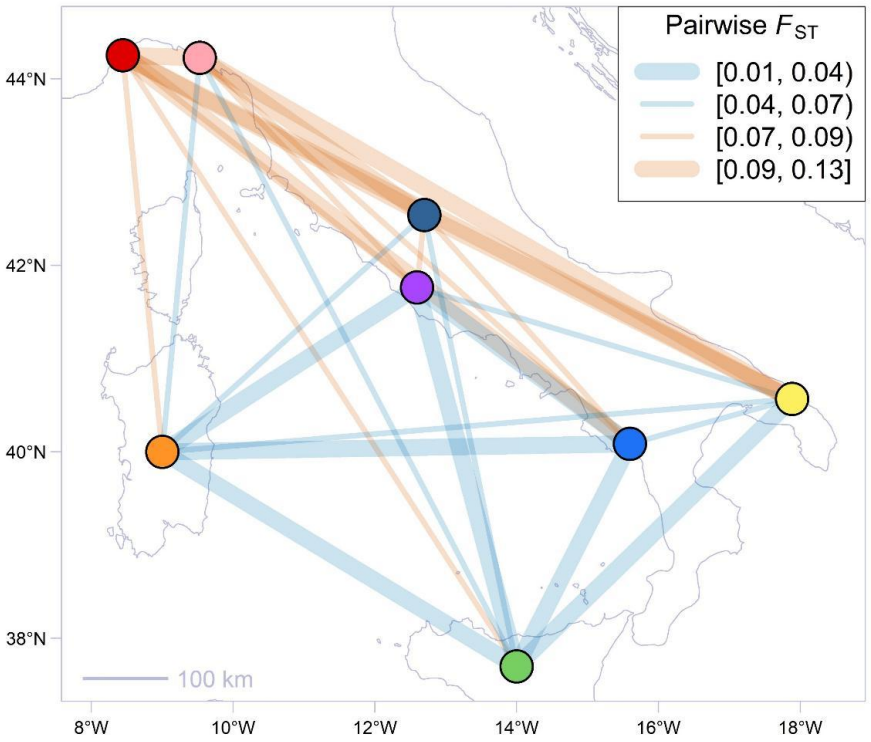

Fig. 7 – Valori di differenziazione genetica per coppie di cluster genetici individuati mediante algoritmi di clustering

Per ciascuna delle 40 popolazioni di sughera e per ciascuno dei cluster genetici individuati mediante algoritmi di clustering, è stata calcolata, inoltre, l'eterozigosi attesa pesata (μH_e). Questo parametro tiene in conto, nella sua formulazione, dell'eterogeneità nel numero di individui per popolazione, rendendo di fatto possibile confrontare popolazioni di numerosità diversa.

Resta interessante sottolineare che, seppure in un contesto generale di uniformità, è possibile osservare una distribuzione spazialmente aggregata delle popolazioni con i valori più alti di μH_e (principalmente in Calabria e Sicilia) e, altresì, delle popolazioni con i valori più bassi (soprattutto tra Liguria e Toscana settentrionale, e nel nord della Sardegna (Fig. 8).

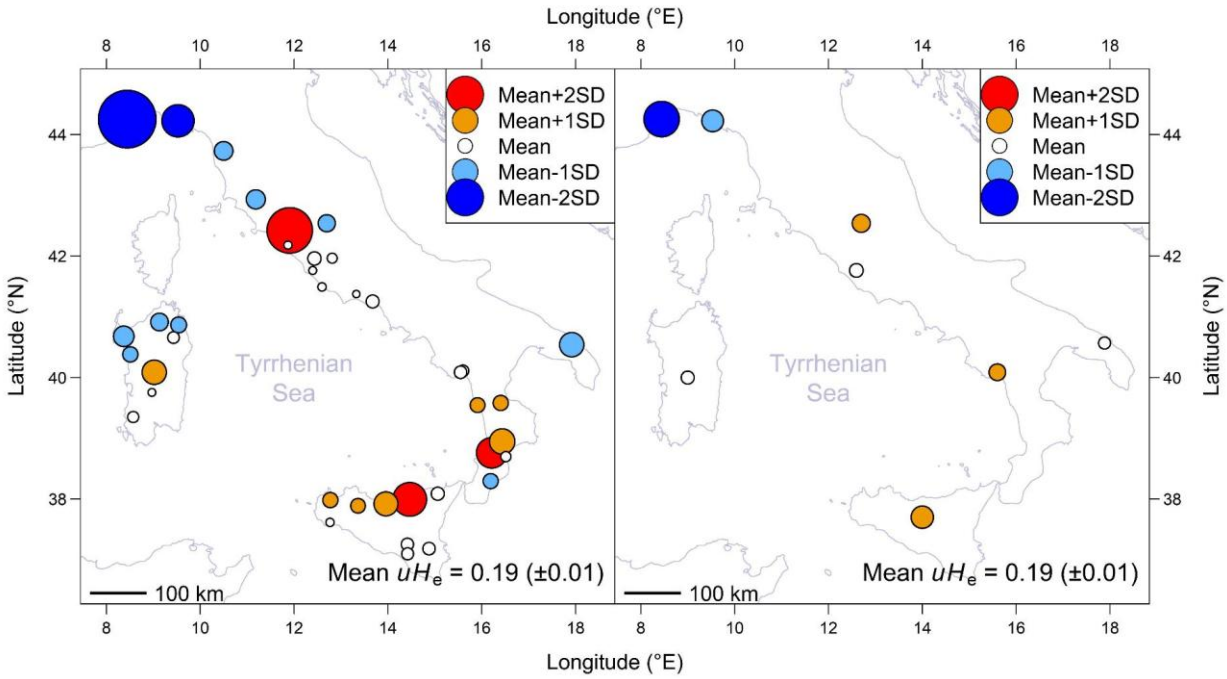

Fig. 8 – Mappa dei valori di eterozigosi attesa pesata (μH_e). La dimensione dei cerchi è proporzionale allo scostamento dal valore medio della distribuzione. I cerchi azzurri/blu e arancioni/rossi rappresentano popolazioni con valori di μH_e rispettivamente inferiori e superiori alla media (di una o due deviazioni standard, rispettivamente). La mappa a sinistra riporta i valori per popolazione, mentre quella a destra per cluster genetico.

5) Selezione delle popolazioni di sughera per la raccolta delle ghiande e la produzione di postime

I risultati sulla struttura genetica delle popolazioni italiane di sughera (Fig. 6) e i valori di differenziazione genetica per coppie di cluster genetici individuati mediante algoritmi di clustering (Fig. 7) hanno permesso la selezione delle popolazioni da cui raccogliere le ghiande Tab. 3) per la produzione di postime da destinare alla realizzazione dei 3 common garden (Lazio,

Tab. 3 – Elenco delle popolazioni italiane di sughera selezionate per la raccolta delle ghiande per la produzione di postime presso il vivaio di Campulongu a Oristano..

N.	Regione	Cod. Pop.	Località	N. ghiande seminate
1	Sicilia	CAL	Calatafimi (TP)	504
2	Sicilia	SPI	Santo Pietro (CT)	1296
3	Calabria	SER	Serrastretta (CZ)	936
4	Sardegna	CUS	Cusseddu (SS)	1416
5	Sardegna	SUS	S'usula (OT)	576
6	Lazio	CPZ	Castelporziano (Roma)	960
7	Toscana	PIE	Pietratonda (GR)	768
8	Umbria	MIR	Miranda (TR)	1152
9	Campania	AVC -ALB	Ispani - Vibonati (SA)	1728
10	Puglia	PRE	Bosco Preti (TA)	720
11	Liguria	DVM	Deiva Marina (SP)	1152
12	Liguria	BER	Bergeggi (SV)	768

Sicilia e Sardegna) previsti nella fase 2 dello sviluppo progettuale. Dato che la sughera ha produzioni di seme irregolari, si è pensato di procedere prima possibile alla raccolta delle ghiande nelle 12 località selezionate. La raccolta è stata portata a termine nei mesi di dicembre 2025 e gennaio 2026 e le ghiande sono state prontamente inviate in Sardegna e seminate presso il al vivaio di Campulongu entro il mese di febbraio 2026 (Tab. 3).

Attività previste nella proposta di progetto QUBER non realizzate.

Le attività di campionamento foglie e di caratterizzazione genetica di 3 popolazioni naturali di sughera del nord Africa provenienti da Tunisia, Algeria e Marocco, previste nella proposta di progetto QUBER, non sono state realizzate a causa delle difficoltà sorte nel definire accordi di collaborazione con enti o strutture di ricerca dei citati Paesi del nord Africa.

Bibliografia

Bhatia G, *et al*. (2013) Estimating and interpreting F_{ST}: the impact of rare variants. *Genome Research* 23: 1514–1521

Frichot E, Francois O (2015) LEA: an R package for Landscape and Ecological Association studies. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 925–929

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583–589

Pinosio S, *et al*. (2026) The FORGENIUS genomic resources: new genotyping tools and genomic data for 23 European forest tree species and their Genetic Conservation Units. *Molecular Ecology Resources*, in corso di stampa

Scaglione D, *et al*. (2019). Single primer enrichment technology as a tool for massive genotyping: a benchmark on black poplar and maize. *Annals of Botany* 124: 543–551

Il responsabile scientifico del progetto QuBER
Prof. Maurizio Sabatti

Il Direttore del DIBAF
Dipartimento Capofila
Prof. Piermaria Corona

Allegato 1

Procedura di campionamento foglie di sughera nell'ambito del progetto QuBER

Una volta selezionata una pianta adulta nella popolazione da campionare:

- registrare **posizione GPS**
- applicare **targhetta** (altezza viso, chiodo 8 cm inserito per max ¼, se in luoghi di passaggio come sentieri, strade, etc., posizionarla dal lato opposto a quello visibile per evitare che venga staccata)
- misurare **diametro** a petto d'uomo (il dato non verrà usato, servirà solo per avere un'indicazione spannometrica della struttura del bosco nel caso di risultati poco interpretabili, quindi non è rilevante evitare o meno il sughero)
- **prelevare** da 5 (se grandi) a 10 (se piccole) **foglie** senza apparenti difetti, più giovani sono meglio è, e inserirle nella tea bag su cui va scritto il codice numerico della pianta (quello della placchetta).
- A questo link trovate un *template* di una scheda di campo, vedete voi se siete più comodi a utilizzarla durante i campionamenti o se fate meglio a scrivere il diametro direttamente sulle bustine e memorizzare la posizione su file gpx. L'importante è che raccogliate tutti i dati per compilare debitamente la tabella on-line che trovate qui.
- La pianta successiva dovrà essere **almeno a 25 m dalla precedente**. Ovviamente potranno esserci eccezioni nel caso di popolazioni estremamente piccole oppure che si trovano in situazioni logistiche estreme.

La disposizione delle 16 (min)-20(max) piante campionate non è particolarmente rilevante (consigliamo di selezionarle lungo un transetto lineare, una griglia quadrata oppure un cerchio), l'importante è la spaziatura (si veda sopra) e che condividano grosso modo le stesse condizioni ambientali (ad esempio, è sconsigliabile un transetto in cui ci siano 200 m di altitudine di differenza tra la prima e l'ultima pianta, oppure campionare due gruppi di piante uno sulla cima di una collina e l'altro in una depressione del terreno). Se possibile, quindi, meglio evitare grosse distanze tra una pianta e la successiva (>50 m).

Quando i campioni sono stati raccolti, inserire subito le tea bag nella busta di plastica con il silica gel. Tornati in ufficio, se possibile, mettere il materiale con il silica gel in stufa a 30-35°C per almeno 24 h. Una volta seccato il materiale inserirlo nuovamente nella busta di plastica, cercando di togliere più aria possibile, in attesa della spedizione. Inserite anche tutti i dati delle piante campionate nella tabella "Dati_QUBER" che trovate a questo link.

Non è necessario spedire ogni singola popolazione. Cercare anzi di effettuare il numero minimo di spedizioni possibile, a meno che non si campionino le popolazioni assegnate in un arco temporale eccessivamente lungo (se campionate tutto in un mese fate pure una spedizione unica, se campionate in tre mesi meglio una spedizione intermedia). Spedite il materiale a:

Dott.ssa Ilaria Spanu, CNR-IBBR, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI)