



LIFE4FIR
Manual con indicaciones operativas,
protocolos y procedimientos



LIFE18 NAT/IT/000164
01/08/2019 - 31/07/2023



LIFE4FIR es un proyecto cofinanciado con la contribución
del instrumento financiero LIFE de la Unión Europea

AUTORES

Montserrat Arista
Francisco J. Balao
Sara Barberini
Giuseppe Bazan
Carla Benelli
Peppuccio Bonomo
Roberto Danti
Gianni Della Rocca
Jose C. Del Valle
Giuseppe Di Noto
Giovanni Emiliani
Arcangela Frascella
Anna Geraci
Maria Antonietta Germana
Tolga Izgu
Francisco J. Jimenez Lopez
Nourhene Jouini
Maurizio Lambardi
Gaetano La Placa
Vincenzo Lo Meo
Angelo Messina
Giuseppe Messina
Giulia Mirabile
Domenica Nucera
Elisabetta Oddo
Pedro Luis Ortiz
Biagio Sabatino
Rosario Schicchi
Stefano Secci
Waed Tarraf
Anass Terrab

ÍNDICE

1. ANÁLISIS GENÉTICOS PARA LA GESTIÓN DE LA CONSERVACIÓN	6
2. AUMENTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>A. NEBRODENSIS</i>	11
3. PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE PLÁNTULAS SELECCIONADAS EN VIVERO	14
4. MEDIDAS PARA MANTENER LA POBLACIÓN NATURAL	20
5. MEDIDAS DE CONSERVACIÓN EX SITU	27
6. REPOBLACIÓN CON PLÁNTULAS SELECCIONADAS	42

1. ANÁLISIS GENÉTICOS PARA LA GESTIÓN DE LA CONSERVACIÓN

Una de las principales actividades del proyecto LIFE4FIR ha sido la evaluación de la variabilidad genética y las relaciones genéticas entre los 30 árboles adultos y las 118 plantas juveniles de la población natural de *Abies nebrodensis*. El conocimiento de estos aspectos es fundamental para la conservación de la especie mediante una gestión activa (rescate genético) basada en cruces controlados.

Se utilizó el genotipado SNPs para realizar la caracterización genética tanto de los árboles adultos como de los juveniles de la población natural. Posteriormente, se realizaron pruebas de paternidad en las plántulas para determinar la tasa de xenogamia (cruce entre individuos no emparentados), endogamia y autofecundación y evaluar la tasa de introgresión (eventual hibridación) debida a la fecundación de los conos femeninos con polen procedente de abetos foráneos (*Abies alba* y *Abies cephalonica*). A continuación se detallan los pasos seguidos para alcanzar los objetivos de estas acciones.

1.1 Selección de SNPs

Se identificaron SNPs informativos y de alta calidad mediante secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción (RAD-Seq). Para el genotipado de los SNP se utilizó la tecnología OpenArrays basada en PCR (Thermofisher Inc., Estados Unidos). Se desarrolló un panel de 120 SNPs para el genotipado de individuos de *A. nebrodensis* compuesto por SNP que ofrecían buena información en muestras de *A. nebrodensis*, *A. alba* y *A. cephalonica*. Entre ellos, se seleccionaron 20 SNPs por su poder para discriminar híbridos putativos entre *A. nebrodensis* y las otras dos especies de *Abies* mediante un PCoA (análisis de coordenadas principales). Los 100 SNPs restantes se seleccionaron para analizar la estructura genética de la población y para realizar pruebas de paternidad.

1.2 Genotipado de *Abies nebrodensis*, análisis de la diversidad genética y estructura de *A. nebrodensis*

Se muestrearon todos los árboles adultos ($n=30$) y los individuos jóvenes de más de 5 años ($n=118$) de la población natural de *A. nebrodensis*, recogiendo algunas acículas de cada uno de ellos. Estas muestras se conservaron en gel de sílice hasta las posteriores extracciones de ADN.

Estructura de la población.

Para estudiar la estructura poblacional en *A. nebrodensis* se utilizó el análisis discriminante de componentes principales (DAPC), realizado mediante el paquete "adegenet" para el software R v.4.0.3.

Nivel de endogamia.

A partir del pedigrí estimado, se evaluó el nivel de endogamia mediante el coeficiente de endogamia de la población (F_{is}) usando el software Colony2. Además, se estimó el tamaño efectivo de la población (N_e), que es un parámetro clave en genética de poblaciones ya que estima el número de individuos adultos que contribuyen de manera efectiva con descendencia a la siguiente generación.

Diversidad genética.

La diversidad genética de los árboles adultos se evaluó calculando los siguientes coeficientes PHt (proporción de loci heterocigotos en un individuo), H_s (heterocigosidad estandarizada basada en la heterocigosidad media esperada), IR (parentesco interno), HL (homocigosidad por locus) e INBR (coeficiente de endogamia). Principalmente estos coeficientes reflejaron una homocigosidad moderada de las plantas de *A. nebrodensis* debida a la endogamia y la autofecundación.

Parentesco genético entre árboles.

Se calculó el estimador de Ritland (RIT) de coancestría por pares entre individuos adultos para conocer el parentesco genético de los 30 árboles adultos de *A. nebrodensis*. Para la gestión genética de la

población, se detectaron los cruces entre individuos menos parecidos genéticamente entre sí (con valores de RIT más negativos) y se elaboró una lista de los 30 cruces más recomendables entre los adultos de *A. nebrodensis*. Estas indicaciones se siguieron para aumentar la variabilidad genética en las progenies mediante cruces controlados.

	Pht	Hs_exp	IR	HL	INBR
13M	0.49	1.13	-0.12	0.50	-0.20
22M	0.42	0.97	0.02	0.57	-0.02
29M	0.42	0.97	0.01	0.57	-0.01
12M	0.40	0.93	0.13	0.57	-0.01
14M	0.40	0.93	0.09	0.59	0.02
26M	0.40	0.93	0.08	0.58	0.04
10M	0.39	0.90	0.13	0.61	0.17
18M	0.39	0.90	0.11	0.61	0.12
11M	0.36	0.83	0.15	0.61	0.11
17M	0.36	0.83	0.17	0.63	0.10
20M	0.35	0.81	0.15	0.63	0.06
23M	0.34	0.79	0.16	0.63	0.07
8M	0.34	0.79	0.29	0.64	0.57
2M	0.33	0.76	0.23	0.65	0.15
9M	0.33	0.76	0.23	0.66	0.12
15M	0.32	0.74	0.22	0.67	0.08
24M	0.32	0.74	0.22	0.66	0.13
25M	0.32	0.74	0.23	0.66	0.18
4M	0.31	0.72	0.28	0.67	0.25
6M	0.30	0.69	0.27	0.68	0.20
7M	0.30	0.69	0.31	0.69	0.20
28M	0.28	0.65	0.34	0.71	0.17
1M	0.26	0.60	0.37	0.74	0.25
27M	0.26	0.60	0.39	0.73	0.31
21M	0.25	0.58	0.44	0.75	0.55
32M	0.25	0.58	0.45	0.74	0.36
30M	0.21	0.49	0.54	0.78	0.61
19M	0.18	0.42	0.63	0.83	0.79
16M	0.16	0.37	0.59	0.83	0.40
31M	0.14	0.32	0.68	0.86	0.65

Tabla 1-1. Estimaciones de la diversidad genética de los árboles adultos. Pht (proporción de loci heterocigotos en un individuo) Hs (heterocigosidad estandarizada basada en la heterocigosidad esperada media) IR (parentesco interno) HL (homocigosidad por locus) e INBR (coeficiente de endogamia). Los colores de los coeficientes varían de valores más bajos (azul oscuro) a valores más altos (amarillo).

1.3 Prueba de paternidad de plantas de regeneración natural de *A. nebrodensis*

Se llevaron a cabo pruebas de paternidad en plántulas de regeneración natural para determinar la tasa de entrecruzamiento, endogamia y autofecundación y para evaluar la eventual hibridación de *A. nebrodensis* con polen procedente de especies de *Abies* no autóctonas. Las pruebas de paternidad realizadas permitieron deducir el origen de todos los individuos jóvenes.

En el caso de algunas plántulas, sólo se pudo inferir el origen de uno de los progenitores de la población, por lo que se consideraron híbridos putativos con otras especies de *Abies*. Para arrojar luz sobre el posible origen híbrido de estos individuos, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando 95 loci presentes en *A. nebrodensis*, *A. cephalonica* y *A. alba*. Esto permitió verificar genéticamente los posibles híbridos con cualquiera de las tres especies de abeto.

1.4 Caracterización genética de los plantones criados en el vivero local

Las plántulas cultivadas en el vivero local antes del inicio del proyecto representan el primer paso de selección para la reforestación, por lo que es importante desentrañar su origen genético y determinar las tasas de xenogamia (cruce entre individuos no emparentados), endogamia y autofecundación, así como evaluar la tasa de introgresión (hibridación eventual) debida a la fecundación de los conos femeninos con polen procedente de abetos foráneos (*Abies alba* y *A. cephalonica*). Tras el genotipado de SNPs, se caracterizaron genéticamente 2064 individuos jóvenes de *Abies nebrodensis* procedentes del vivero local procedentes de polinización libre de 8 árboles madre usando el software Colony2.

El nivel de endogamia de las plántulas analizadas se estimó calculando el coeficiente de endogamia (F_{is}). También se calculó el tamaño efectivo de la población (N_e) para estimar el número de individuos que efectivamente podrán en un futuro aportar descendencia a la siguiente generación. Estos resultados fueron útiles para seleccionar

las plántulas de vivero que se emplearían en las nuevas parcelas de reforestación.

1. Seedlings genetically characterized:	1776 (86.05% of total seedlings)
a) Seedlings whose parental origin was confidentially inferred:	1525
a.1) Both parents are <i>A. nebrodensis</i> adult-trees:	897
a.2) One of the parentals is <i>A. nebrodensis</i> , but the other one is unknown (i.e. another <i>Abies</i> species):	345
a.3) Both parents are unknown (i.e. another <i>Abies</i> species):	283
b) Seedlings whose parental origin could not be confidentially inferred:	251
2. Seedlings that could not be genetically characterized:	288 (13.95% of total seedlings)

Tabla 1-2. Resultados de la caracterización genética de las 2064 plantas jóvenes de *Abies nebrodensis* muestreadas en el vivero local Piano Noce.

2. AUMENTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN A. NEBRODENSIS

Las poblaciones pequeñas y aisladas corren el riesgo de extinguirse debido a la depresión por endogamia, la pérdida aleatoria de variación genética beneficiosa y por tanto la menor adaptabilidad a los cambios ambientales. La disminución de la variabilidad genética puede, de hecho, conducir a una menor capacidad de las poblaciones para adaptarse a los nuevos retos propuestos por su entorno, como las enfermedades infecciosas o el cambio climático.

El rescate genético es el aumento del tamaño de la población mediante el movimiento de nuevo material genético de una población a otra. Esto puede ocurrir mediante la intervención humana o la migración natural. Como herramienta de conservación, esta estrategia puede aumentar la diversidad genética de poblaciones pequeñas y aisladas y ayudarlas a recuperarse de la endogamia. En el caso de *Abies nebrodensis*, la fragmentación de la población y el aislamiento de las plantas favorecen la autofecundación con efectos deletéreos para la progenie y las posibilidades evolutivas de la especie.

En el proyecto LIFE4FIR se ha desarrollado un plan de polinización controlada para promover los cruces entre plantas aisladas y favorecer las nuevas combinaciones genéticas. Los cruces deben tener en cuenta factores como el aumento de la aptitud reproductiva en términos de cuajado de frutos, número de semillas, tasa de germinación y supervivencia de las plántulas, ya que la polinización abierta conduce principalmente a la autofecundación.

2.1 Realización de cruces controlados

Seguimiento y detección del inicio de la plena floración.

En la población natural de *A. nebrodensis* la floración se produce generalmente a principios de mayo. Por lo tanto, a partir de la segunda quincena de abril, los árboles adultos deben controlarse siguiendo la apertura de las yemas de los conos florales y su desarrollo hasta el momento de dispersión del polen y receptividad de los conos

femeninos. La dispersión del polen y receptividad de los óvulos se produce de forma escalonada, dependiendo de la altitud y puede ser extremadamente variable de un año a otro. Por lo general, una producción de conos abundante (masting) se produce cada 4 años, intercalándose con años en los que la producción es escasa o nula y años en los que es parcial (poco abundante).

Aislamiento de los conos femeninos.

Antes de la apertura de los conos masculinos y de la liberación del polen, se aislaron los conos femeninos con bolsas de un material especial de papel hidrófobo, que al mismo tiempo permite la transpiración. Las bolsas se cerraron en la base con cinta de goma blanda alrededor de las ramas.



Fig 2-1 Aislamiento de conos femeninos con bolsas especiales de tergal para realizar cruces controlados.

Recogida de conos macho maduros.

Los conos masculinos maduros (próximos a la dispersión del polen) se recogieron por separado para cada uno de los árboles adultos y se almacenaron en bolsas de papel hasta su utilización para la polinización.

Distribución del polen.

Cuando comenzó la receptividad de los conos femeninos, se abrieron las bolsas aislantes y se insertaron los conos masculinos maduros en el interior de las mismas. Los conos masculinos se insertaron por separado en los conos femeninos de cada árbol según la combinación de cruzamiento. Por lo general, se insertaron entre 10 y 15 conos masculinos por cada cono femenino. El movimiento natural de la bolsa debido al viento favorece la dispersión del polen de los conos en el interior de la bolsa permitiendo la polinización de los conos femeninos.

Combinaciones de cruzamientos.

Con el objetivo de favorecer los cruces entre plantas con mayor distancia genética, los emparejamientos se realizaron a partir de los resultados obtenidos de la coancestría entre pares de individuos de la población natural. En mayo de 2020 se utilizaron 174 bolsas y se realizaron 27 combinaciones parentales. En 2022 se realizaron 23 combinaciones de cruzamiento utilizando 121 bolsas. Durante el verano se realizó un seguimiento a intervalos de 15 días del desarrollo de los conos en el interior de las bolsas.

Recogida de conos y semillas.

La maduración de los conos ocurrió a finales de septiembre, momento en que se retiraron las bolsas y se recogieron los conos antes de su desarticulación. Los conos se recogieron de forma individualizadas y las semillas se extrajeron en octubre.

3. PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE PLÁNTULAS SELECCIONADAS EN VIVERO.

Una de las acciones fundamentales del proyecto LIFE4FIR ha sido la producción de plántulas a partir de semillas seleccionadas procedentes de cruces controlados y su desarrollo en condiciones óptimas en el vivero, a fin de obtener una población vigorosa y mejorada que se utilizará para la reforestación. Para alcanzar este objetivo se han llevado a cabo una serie de actividades diversificadas en el vivero.

3.1 Evaluación del estado sanitario de las plantas que crecen en el vivero.

Encuesta fitosanitaria.

Al inicio del proyecto, se realizó un estudio fitosanitario de las plántulas de origen conocido que ya crecían en el vivero. Para cada planta madre y año de siembra, las progenies fueron sometidas a una inspección visual, registrando la tasa de mortalidad y los tipos de síntomas observados, su frecuencia y su impacto (porción de corona dañada). De este modo se obtuvo una imagen del tamaño de cada progenie y de la frecuencia de los principales síntomas observados.

	sector 1		sector 14		sector 15		Tot.	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
mortality	459	5,04	7	0,34	142	1	608	2,4
reddened needles	145	1,6	10	0,5	117	0,81	272	1,07
chlorosis	190	3,82	17	0,84	764	5,35	971	3,82
defoliation	9	0,1			35	0,24	44	0,17
small needles					6	0,04	6	0,02
blighted shoots	12	0,13	4	0,19	8	0,08	24	0,1
stunted growth			47	2,32	64	0,45	111	0,43

Tabla 3-1. Impacto (en número y porcentaje) de los principales síntomas observados en la parte aérea de las plántulas criadas en los tres sectores del vivero.

Muestreo y análisis de la presencia de patógenos.

En el caso de los trastornos del follaje se tomaron muestras de acículas y ramitas de las plantas sintomáticas para su posterior observación en el laboratorio. Las muestras se inspeccionaron cuidadosamente para definir en detalle los signos de colonización por patógenos (reacción tisular, desarrollo de cuerpos fructíferos fúngicos, etc.) y para el aislamiento in vitro de microorganismos fúngicos. Los aislamientos se realizaron a partir de acículas (enrojecidas, total o parcialmente necrosadas) y de brotes marchitos, previa esterilización de la superficie. Las muestras se colocaron en placas de PDA (agar de dextrosa de patata) y se incubaron a 25°C en la oscuridad. Las colonias germinadas se subcultivaron y luego se agruparon por morfotipos en función de sus características de cultivo. Los morfotipos se identificaron mediante la secuenciación de regiones específicas del ADN genómico utilizando los cebadores ITS1 e ITS4.



Fig 3-1 Síntomas de agujas enrojecidas y marchitas observados en las plantas jóvenes de *A. nebrodensis* criadas en el vivero local.



Fig. 3-2 Colonias de hongos crecidas en placas PDA aisladas de agujas afectadas recolectadas en el vivero.

Evaluación de la presencia de patógenos del suelo.

El suelo de las plátulas del vivero puede albergar microorganismos patógenos (oomicetos, hongos, bacterias, nematodos). La presencia de oomicetos peligrosos de suelo, como *Phytophthora* sp., no puede pasarse por alto en el entorno de un vivero. Este oomiceto ataca el

sistema radicular provocando un deterioro general de toda la planta (retraso del crecimiento, clorosis, defoliación). Debe prestarse especial atención cuando los síntomas de decaimiento y muerte se extienden por una zona o parcela del vivero, afectando a muchas plantas contiguas. Por este motivo, es aconsejable que se analicen las muestras de suelo y raíces tomadas de las macetas de las plantas con síntomas. La presencia de *Phytophthora* sp. se determinó mediante métodos tradicionales que utilizan cebos para su aislamiento directo a partir del suelo, restos orgánicos y raíces. Su identificación se logró con la amplificación y secuenciación del locus ITS.

Parámetros ecofisiológicos y riego.

Para optimizar el riego de las plantas, se utiliza el estudio de sus relaciones hídricas (componentes del potencial hídrico xilemático) ya que permite establecer el tipo de estrategia que adopta la planta para responder al déficit hídrico y, al mismo tiempo, identificar indicadores sencillos y eficaces para ser utilizados en la gestión de los recursos hídricos. Las curvas presión-volumen (P-V) permiten describir la relación entre el potencial hídrico total (Ψ_t) y sus componentes en función del contenido relativo de agua (R) de los organismos vivos. Estos parámetros ayudan a establecer la cantidad correcta de agua que debe administrarse y el método de suministro.

Análisis del suelo.

Los análisis químico-físicos de muestras de suelo permiten verificar las características de la mezcla utilizada para la germinación y el cultivo de plantas en maceta, y evaluar los cambios con respecto al óptimo de la especie. Los parámetros de pH, conductividad eléctrica (CE), contenido en materia orgánica y carbonatos totales permiten definir las propiedades del suelo. Las muestras de suelo tomadas de las plantas en maceta en el vivero Piano Noce presentaban variaciones, fundamentalmente en los niveles de salinidad (CE) y el contenido total de carbonatos. Por lo tanto, surgió la necesidad de utilizar un sustrato de crecimiento estandarizado y optimizado para *A. nebrodensis*.

3.2 Medidas para mejorar la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Selección de semillas llenas (con embrión viable).

Mediante el uso de un dispositivo de rayos X (Gilardoni radiolight), se desarrolló en el IBE-CNR un procedimiento para seleccionar semillas llenas. En semillas obtenidas por polinización libre en 2020 de 11 árboles adultos de la población natural de *A. nebrodensis*, el porcentaje de semillas llenas osciló entre 0 (obtenido para el árbol nº 19) y 54% (obtenido para el árbol nº 7) con un valor medio estimado de 31,7%. La utilización únicamente de semillas llenas permite optimizar los recursos y obtener mejores resultados en las siembras.

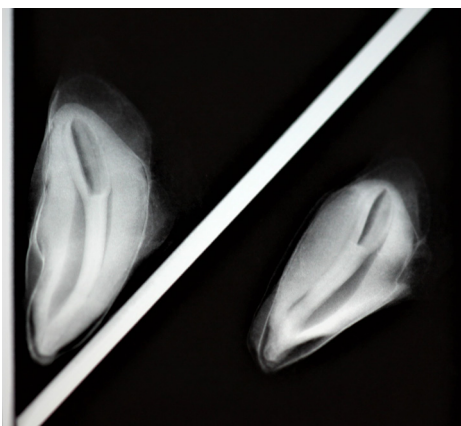


Fig 3-3 Semillas completas sanas (con embrión dentro) de *A. nebrodensis* fotografiadas con rayos X.

Utilización de un sustrato estandarizado.

Se desarrolló un sistema de cultivo en maceta para *A. nebrodensis* que tuvo en cuenta parámetros físicos y químicos estandarizados capaces de mejorar tanto la germinación de las semillas como el crecimiento de las plántulas. Entre los diferentes sustratos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron con la tierra completa Vigorplant, adicionada con Agriperlita (en proporción 70 lt + 10 lt), con la que se observó un porcentaje de germinación que osciló entre el 20% y el 80% entre lotes de semillas de diferentes plantas madre, con una media del 31,4%.

Uso de bandejas de semillas.

Este tipo de contenedor permite obtener algunas ventajas: fácil manejo en el vivero, buena germinación, alta densidad de plántulas por unidad de superficie, menor necesidad de espacio y, sobre todo, menor estrés de trasplante para las plántulas. Este último punto es de vital importancia ya que más del 90% de las pérdidas en el vivero se producen inmediatamente después del trasplante. De hecho, la extracción suele causar roturas de las raíces que provocan la muerte de las plántulas. La siembra en bandejas evita este tipo de problemas, ya que el cepellón (raíces y tierra) de las plántulas permanece intacto en el momento de la extracción.

Micorrización.

Para la micorrización de plántulas se utilizó el basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* (Pers.), conocido como simbionte ectomicorrícico en *A. alba* y *A. cephalonica*. Las plántulas de un año se inocularon en diciembre en el momento del trasplante, utilizando 20 ml de una suspensión de esporas de *P. tinctorius* a una concentración de 107 esporas/ml por planta. Las plántulas inoculadas se trasladaron al invernadero y se regaron regularmente para acelerar la colonización fúngica.

Al final del verano siguiente, se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de la micorrización. Se trasplantaron plántulas de un año de la bandeja de germinación y se transfirieron a macetas de 8 x 12 cm que contenían el mismo sustrato de crecimiento (Vigorplant + agriperilte). Las plántulas se mantuvieron en el nuevo contenedor al menos un año más hasta que se plantaron en las parcelas de reforestación. Al final del verano siguiente se evaluó la eficacia de la micorrización. En comparación con las plántulas no inoculadas, las inoculadas mostraron acículas de color verde intenso y un mejor crecimiento vegetativo con producción de las primeras ramas laterales. En promedio, las plántulas inoculadas fueron más altas que las no inoculadas (alrededor de 1,5 cm de diferencia), tuvieron un cuello de raíz más grueso (2 mm frente a 1 mm) y un Índice de Micorrización (IM) más alto (7,84 frente a 6,25). El peso seco de las plántulas inoculadas (tanto de la parte epigea como del sistema radicular) también fue 2-3 veces mayor que el de los controles no inoculados.



Fig 3-4 Después de ser trasplantadas, las plántulas fueron tratadas con una suspensión del hongo micorrízico *Pisolithus arhizus*.

4. MEDIDAS PARA MANTENER LA POBLACIÓN NATURAL

4.1 Seguimiento y estudio del estado de salud.

La evaluación y el seguimiento del estado de salud de la población natural proporcionan conocimientos útiles sobre los trastornos que se producen y pueden ayudar a la gestión para la protección y conservación. El estudio fitosanitario de la población de *A. nebrodensis* es una de las medidas fundamentales para evaluar el estado de salud de los árboles.

Inspecciones de las copas.

Los 30 individuos adultos de *A. nebrodensis* fueron sometidos anualmente a un minucioso examen visual para evaluar la forma de la copa y transparencia de la copa sana, follaje girado, presencia de partes moribundas, secas o dañadas, y aparición de lesiones. Los trastornos observados en la copa se describieron registrando el tipo de órgano afectado (tronco, ramas, ramitas, yemas, acículas), la porción de la copa afectada, idealmente dividida en tres partes a lo largo del eje longitudinal (tercio inferior, intermedio y superior), la dirección (norte, sur, este y oeste), el impacto en términos de porcentaje de copa dañada y número de ramitas marchitas o enrojecidas por unidad de superficie. Los resultados de las inspecciones de las copas se relacionaron con las condiciones ambientales a las que se enfrentan los árboles a nivel de microclima y de emplazamiento.



Fig 4.1 Copa de un árbol de *A. nebrodensis* que muestra agujas enrojecidas, caída de agujas y brotes marchitos.

Muestreo y aislamiento de hongos.

En los árboles de la población natural con trastornos en la copa se tomaron muestras de 4 ramas que mostraban enrojecimiento de las acículas y tizón. Junto a las ramas sintomáticas se recogieron ramitas sanas asintomáticas. Se desprendieron diez acículas de cada ramita muestreada para aislar los hongos. En total, se utilizaron 250 acículas enrojecidas y 250 verdes (sanas) para los aislamientos. Las colonias obtenidas se agruparon en morfotipos en función de sus características morfológicas. La frecuencia de aislamiento (IF) se calculó como porcentaje del número total de fragmentos por placa. Para la identificación de los taxones fúngicos mediante el código de barras de ADN, se utilizaron 1-3 aislados de cada morfotipo para la extracción de ADN. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4. Las secuencias resultantes se cotejaron para su identificación con las secuencias disponibles en el GenBank utilizando la herramienta en línea Blast.

4.2 Estudios multiespectrales.

Los estreses bióticos o abióticos actúan sobre la fisiología y la bioquímica de los árboles modificando la radiación absorbida o reflejada por el follaje. La reflectancia espectral se basa en la absorción ejercida por el agua y la clorofila de la hoja. Se detectaron varias zonas de sombra dentro del follaje debido al tipo, la salud, la estructura de las hojas y el contenido de humedad de las plantas. Al principio y al final del proyecto se realizaron prospecciones con drones en la población natural de *A. nebrodensis*. En el estudio se utilizaron dos cámaras: 1) cámara RGB convencional para crear una ortofoto del terreno y un modelo digital de elevación y encontrar correlaciones entre las características topográficas y las tensiones ambientales; 2) cámara multiespectral para obtener 4 imágenes simultáneas para cada banda (rojo, borde rojo, verde, infrarrojo cercano). Con estas imágenes se crearon mapas de reflectancia a partir de los cuales se obtuvieron diferentes índices de vegetación. Las imágenes multiespectrales se analizaron adecuadamente para la elaboración de un mapa NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), es decir, un indicador que

describe la intensidad y la distribución del verdor, la densidad relativa y la salud de la vegetación para cada elemento de la imagen, o píxeles, en una imagen de dron. Los mapas multispectrales permitirán seguir la evolución en el tiempo del estado de salud de los árboles en función de las fluctuaciones climáticas y de las medidas de conservación que se apliquen entretanto.

4.3 Apoyo a la regeneración natural.

Diversos factores limitan el crecimiento y el reclutamiento de la regeneración natural de *A. nebrodensis*: suelos poco profundos y rocosos, producción de conos y fructificación irregulares a lo largo de los años, elevada tasa de autofecundación, alto porcentaje de semillas vacías, e impacto de herbívoros silvestres que dañan las plántulas. La regeneración natural se produce principalmente entre arbustos de enebro en cojín y retama, bajo la cubierta de hayas o en presencia de una capa húmeda de musgo, donde se dan condiciones microclimáticas favorables y protección (facilitación).

Censo y cartografía de la regeneración natural.

Se realizaron prospecciones in situ para seguir y controlar la evolución de la regeneración natural. Se desarrolló un protocolo de prospección basado en la medición de la distancia en metros y el ángulo acimutal entre cada planta o plántula y el árbol madre más cercano, mediante el uso de una brújula profesional.

Se prepararon tablas de prospección con los parámetros que debían registrarse: número del árbol madre (PM) y posición con GPS, ID de la plántula, distancia desde el PM, azimut, altura (cm), edad, estado vegetativo y sanitario, o cualquier otra anotación. Los datos recogidos se utilizaron para implementar una base de datos completa y 15 mapas, uno por cada planta madre. Ya no se utilizaron estaquillas con etiquetas para marcar las plantas jóvenes. De hecho, las utilizadas en investigaciones anteriores parecen atraer a los herbívoros silvestres y fueron desprendidas y masticadas por los ciervos poco después de su implantación.



Fig 4-2 Levantamiento y medición de una planta joven de *A. nebrodensis* de la regeneración natural.

Medidas de gestión.

Las prospecciones sobre la regeneración natural permitieron identificar y registrar un total de 484 plántulas de *A. nebrodensis*, repartidas entre 15 plantas madre.

El conocimiento de la ubicación exacta de la regeneración natural y la cartografía realizada sirvieron de referencia para la colocación de los nuevos cercados, destinados a maximizar la protección de las plantas madre y de las plantas jóvenes en fase de establecimiento frente a gamos y jabalíes.

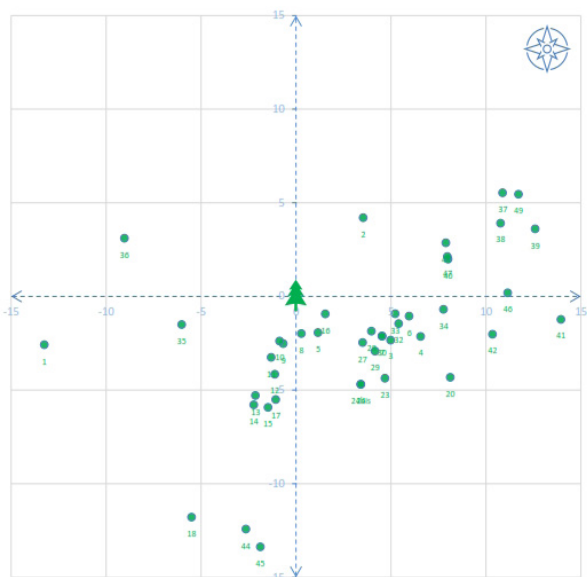


Fig 4-3 Mapa de la regeneración natural del árbol de *A. nebrodensis* n. 18 (ubicado en el centro de la parcela).

4.4 Instalación de un nuevo sistema de vallado.

Para favorecer la supervivencia y el desarrollo de la regeneración natural, es esencial instalar vallas alrededor de los árboles adultos de *A. nebrodensis* para evitar las perturbaciones externas (en particular de los herbívoros salvajes) en la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas que crecen cerca de ellos.

El proyecto LIFE4FIR planificó la ampliación y el refuerzo del sistema de vallado alrededor de los árboles de *A. nebrodensis* para satisfacer tres necesidades fundamentales: 1) sustituir las vallas existentes que estaban deterioradas y ya no eran funcionales; 2) apoyar y proteger la regeneración natural establecida fuera de las antiguas vallas; 3) reforzar la protección de los árboles adultos con vallas más anchas y altas. El nuevo sistema de vallado se diseñó e instaló en una superficie mayor, aumentando la superficie protegida alrededor de los árboles de *A. nebrodensis* a más de 14.000 m² en total. Esta medida garantizará el mantenimiento de unas condiciones vegetativas óptimas, preservará la biocenosis alrededor de cada planta y, en consecuencia, favorecerá la regeneración natural.

Implantación.

Las nuevas vallas están formadas por postes de castaño descortezados con un diámetro no inferior a 7 cm en la parte superior y una altura no inferior a 2,40 m, dispuestos a una distancia media de 2 m y enterrados 40 cm tras calafatear la parte inferior 60 cm con alquitrán frío. Las vallas son de red de alambre de hierro galvanizado con malla degradable de 1,60 m de altura, con un peso mínimo de 0,70 kg por metro. Fueron fijadas (mediante alambre galvanizado) sobre cuatro hileras de alambre de hierro galvanizado de 2,70 mm de diámetro ancladas a los postes mediante grapas y colocadas respectivamente a nivel del suelo, a 1,40 m, 1,60 m y 1,90 m. Cada valla está equipada con una entrada a través de una puerta de 1,5 m de ancho construida utilizando postes de castaño según el esquema previsto por el proyecto. Como los árboles están situados en lugares inaccesibles, la mecanización de cualquier actividad era prácticamente imposible. Al principio fue necesario restaurar y abrir pequeños caminos para llegar a

los árboles. Sólo después fue posible transportar el material necesario para la instalación de las vallas.



Fig.4-4 Las nuevas cercas instaladas alrededor del árbol de *A. nebrodensis* n. 12 como protección contra los herbívoros salvajes.

4.5 Videovigilancia.

Se ha instalado un sistema de videovigilancia como medida disuasoria y para el control de la fauna salvaje y del ganado abandonado.

El sistema se instaló colocando 5 estaciones en los lugares más visitados del área de distribución de *A. nebrodensis*. Para la instalación se utilizaron postes de castaño de 5 m de longitud, con una sección de 18-22 cm en la base y de 12-16 cm en la parte superior. Los postes se enterraron firmemente 1 m, evitando el uso de zócalos de hormigón.

En la parte superior de los postes se instaló el kit compuesto por una cámara tropicalizada (resistente al agua y al polvo) con resolución de 2MP y sensor de movimiento y un panel fotovoltaico de 40 W, equipado con una batería de 20 Ah. A través de un router LTE/4G, las imágenes adquiridas pueden transmitirse a teléfonos móviles mediante tarjetas SIM. Las imágenes también pueden guardarse en memorias SD locales. Posteriormente, el sistema se actualizó para permitir la transmisión en tiempo real de las imágenes adquiridas vía satélite.



Fig 4-5 Una de las cinco estaciones del sistema de videovigilancia.

5. MEDIDAS DE CONSERVACIÓN EX SITU

El proyecto LIFE4FIR ha implementado medidas para asegurar la conservación ex situ del germoplasma de *Abies nebrodensis*, mediante la creación de un huerto clonal y el lanzamiento de un banco de semillas y un criobanco. Estas medidas desempeñarán un papel fundamental en la conservación y gestión del patrimonio genético de esta especie.

5.1 Huerto Clonal

El huerto clonal no está pensado únicamente como una simple colección de germoplasma, sino también como una instalación para la futura producción de semillas caracterizadas por una mayor variabilidad genética, ya que se fomenta la fertilización cruzada entre los diferentes genotipos. El huerto clonal también permitirá el monitoreo constante de los genotipos individuales en cuanto a crecimiento, hábito, fenología, etc., con fines científicos y educativos. En el futuro, cuando las plantas alcancen la madurez, el huerto se utilizará como una nueva fuente de la cual se podrán recolectar semillas u otro material de propagación, evitando impactos negativos en la población natural. Para el establecimiento del huerto clonal, cada genotipo individual de la población natural de *A. nebrodensis* se propagó vegetativamente mediante la técnica de injerto. La disposición de los clones en la parcela ha sido diseñada para fomentar la fecundación cruzada.

Propagación por injerto.

La propagación por esquejes y micropropagación son las técnicas más eficientes de multiplicación vegetativa. Por otro lado, muchas especies de coníferas no responden a estas técnicas, produciendo resultados limitados, insuficientes para garantizar un número adecuado de plantas con fines de reforestación. En todos estos casos (que incluyen a *Abies nebrodensis*) es necesario seguir la propagación por injerto. La técnica de injerto que se ha utilizado en este proyecto se llama “injerto lateral enchapado” (veneer-side grafting), con mucho la más utilizada en los viveros para la propagación por injerto de coníferas.

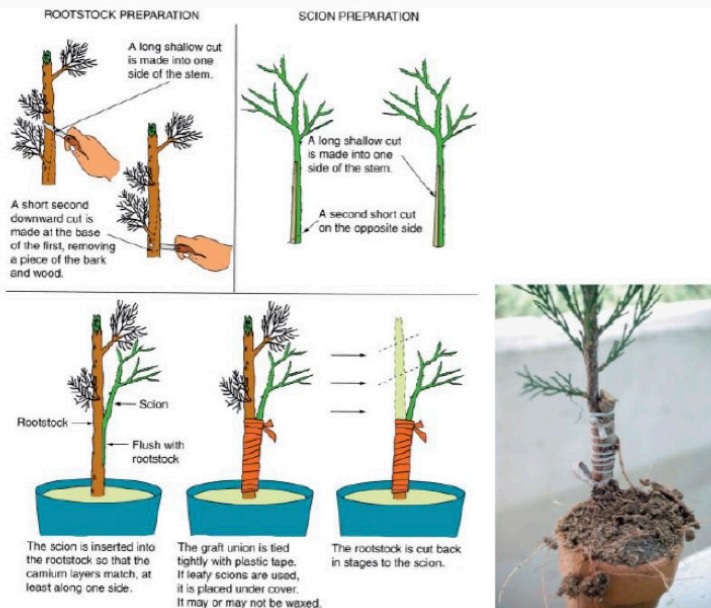
Un protocolo optimizado para *A. nebrodensis*.

El procedimiento específico seguido para la propagación por injerto de *A. nebrodensis* se resume a continuación:

- Preparación de los portainjertos: Dos semanas antes del injerto, los portainjertos (plantas en maceta de *A. nebrodensis*) se trasladaron al invernadero para forzar la actividad vegetativa y el crecimiento de las raíces. Los sustratos se humedecieron, evitando que estuvieran demasiado mojados. Los 7-10 cm inferiores de los tallos de las plantas se mantuvieron limpios eliminando cualquier rama, aguja y tierra presente.
- Recolección de los injertos: Los injertos se recolectaron a principios de abril, tan pronto como las condiciones climáticas lo permitieron dependiendo de la presencia de nieve. Sin embargo, en el momento de la recolección, las plantas todavía tenían los brotes cerrados.
- Almacenamiento de los injertos: Los injertos se mantuvieron a 4°C en una sala refrigerada. El injerto se realizó dentro de los tres días posteriores a su recolección. Los portainjertos, los injertos y el equipo se ensamblaron en una estación de trabajo cómoda en el vivero. Se organizó un equipo de 6 personas (injertadores experimentados, más ayudantes). Los cuchillos de injerto se prepararon extremadamente afilados y limpios.
- Preparación de los injertos: Los injertos recolectados eran brotes terminales, tomados principalmente del tercio inferior del árbol. Los injertos para injertar (10-15 cm de largo) se prepararon eliminando cualquier aguja en la mitad inferior.
- Corte inicial en el portainjerto: El primer corte se hizo en una sección recta, libre de defectos y heridas en los 10 cm inferiores del tallo del portainjerto. Todos los cortes en el injerto y el portainjerto se realizaron en un solo movimiento suave. Esto proporcionó la mejor superficie para unir el injerto con el portainjerto. El primer corte se hizo hacia abajo para crear una pequeña solapa en el tallo del portainjerto. El ancho de este corte fue lo más cercano posible al ancho de los injertos, penetrando aún la corteza del portainjerto.
- Corte en el injerto: Se realizó un corte hacia abajo en el injerto con

un corte en ángulo en el extremo del injerto para crear una solapa. La longitud del corte fue igual a la longitud del corte realizado en el portainjerto.

- **Inserción del injerto:** El injerto se insertó en el “bolsillo” creado en la parte basal cortada del portainjerto; el lado del injerto se alineó con la superficie cortada del portainjerto. Cuando el injerto se hizo correctamente, quedó perfectamente insertado en el bolsillo del portainjerto, con una alineación perfecta de las superficies cortadas.
- **Amarre y protección:** Los injertos se ataron y apretaron con una tira de goma; el área envuelta comenzó y terminó por encima y por debajo de los cortes. El área injertada se cubrió luego con papel de aluminio para evitar el secado excesivo.
- **Mantenimiento de la humedad:** Como las coníferas requieren alta humedad mientras el injerto se está curando, las plantas injertadas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente.



"Veneer-side graft", una técnica de injerto típica de las coníferas

Las plantas injertadas se trasladaron de nuevo al invernadero después de cortar la parte superior del portainjerto. El suelo en las macetas se humedecía periódicamente, evitando el goteo. Se prestó especial atención a evitar la deshidratación del suelo, ya que este es un momento crítico para el éxito de los injertos. Las plantas necesitan luz, pero se debe evitar la radiación solar directa e intensa. Después de 4-5 semanas, se retiró la bolsa de plástico y se cortó otro tercio del portainjerto, justo por encima de la inserción del injerto. Entre mediados y finales del verano, se retiró la banda elástica para evitar que comprima excesivamente el tallo en el punto de unión. Las plantas injertadas se trasladaron luego al exterior, a una zona sombreada del vivero.

Un muestreo realizado 4 meses después del injerto mostró que más del 50% de los mismos tuvieron éxito, un resultado realmente excelente para una especie como *A. nebrodensis*. Las plantas injertadas deben ser apoyadas con estacas durante los primeros dos años para favorecer un tronco recto. La disposición de los genotipos en el huerto clonal se basó en la necesidad de fomentar la fertilización cruzada, también teniendo en cuenta los datos sobre las distancias genéticas entre los ortets.



Fig 5 Propagación por injerto

5.2 Banco de Semillas

Los bancos de semillas representan el sistema de conservación ex situ más utilizado para la conservación de la biodiversidad vegetal. Las muestras de semillas recolectadas de los 30 árboles adultos de *Abies nebrodensis* se almacenan en el Banco de Semillas, recientemente inaugurado en el Museo de *Abies nebrodensis* en el municipio de Polizzi Generosa gracias al proyecto LIFE4FIR. El tiempo máximo de conservación varía según la especie y puede llegar a muchas decenas de años, durante los cuales se repiten periódicamente las pruebas de germinación y viabilidad de las semillas.

Recolección de Semillas.

Los conos maduros se recolectaron de los árboles de *A. nebrodensis* en octubre y luego se secaron hasta el equilibrio en un ambiente controlado. Las semillas maduras se limpiaron de cualquier contaminante restante y su contenido de humedad se midió en una muestra de 3 semillas. El contenido de humedad promedio de 6.3% fue adecuado para su almacenamiento a +4°C, hasta que se utilizaron para futuros experimentos.

Selección de Semillas.

La presencia masiva de semillas vacías, sin embriones, representa un problema para los propósitos de conservación. Por lo tanto, en este proyecto se aplicó un procedimiento basado en una radiografía de lotes individuales de semillas para seleccionar las semillas llenas.

La imagen radiográfica permitió detectar semillas vacías o semillas atacadas por insectos o enfermas, que fueron eliminadas. Las semillas se colocaron en el laboratorio en placas plásticas cuadradas de 100 pocillos (20x20 cm), luego se escanearon y fotografiaron con el dispositivo de luz de radio Gilardoni, Lecco, Italia. El procedimiento óptimo se desarrolló utilizando una película de rayos X, expuesta a una radiación de 25 kV durante 2 minutos, 3 mA (rayos X suaves) a una distancia de 45 cm de la fuente de rayos X. Las imágenes de rayos X se verificaron para la presencia de endospermo y embrión.

En consecuencia, la semilla se consideró anormal si una o ambas estructuras estaban deformadas. Para validar esta técnica, una muestra de semillas se abrió después del examen radiográfico y se verificó bajo un estereoscopio para confirmar la presencia del embrión.

Prueba de Viabilidad de Semillas con Tetrazolio (TTC).

Las semillas maduras se mantuvieron a 4°C durante 6 meses. Se aplicaron ensayos in vitro a las semillas y embriones para evaluar su viabilidad y germinación antes de comenzar la conservación. La viabilidad de las semillas se evaluó con la prueba de tetrazolio (2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio, TTC). La prueba TTC se basa en la reducción de la sal de tetrazolio soluble e incolora a un precipitado rojo insoluble en presencia de actividad deshidrogenasa en células vivas. El embrión teñido de rojo fue el principal indicador de viabilidad de las semillas.

Prueba de Germinación in vitro.

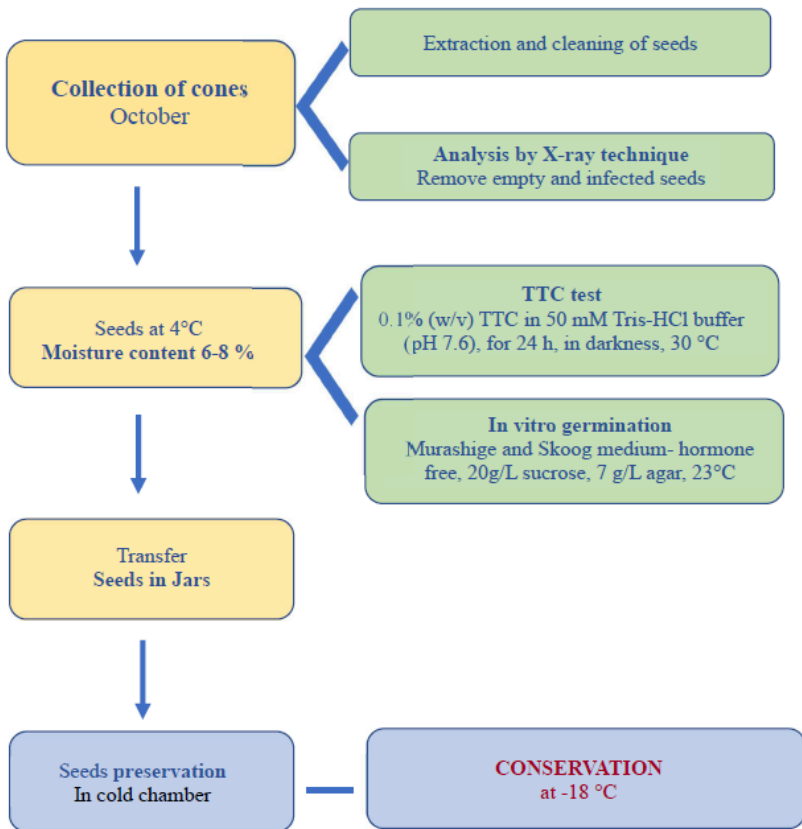
Después de la esterilización superficial con etanol al 70% e hipoclorito de sodio, las semillas se sumergieron en agua durante 48 horas bajo condiciones estériles antes de la extracción de los embriones. La prueba de germinación se realizó utilizando sustrato MS (Murashige y Skoog, 1962) sin la adición de hormonas. Cada dos semanas desde el inicio del cultivo in vitro, se calculó la tasa de germinación como el porcentaje del número de embriones germinados en comparación con el número de embriones cultivados. La tasa de germinación de los embriones muestreados fue del 66-100%.

Almacenamiento de Semillas a Baja Temperatura (-18°C).

Siguiendo el estándar internacional para el almacenamiento de semillas a largo plazo (FAO/IPGRI 1994), la conservación se planificó a -18°C o menos, con un contenido de humedad de las semillas (MC) del 3-7%. Se utilizó una muestra de semillas para probar la efectividad de este procedimiento de conservación. Después de 6, 9 y 12 meses de almacenamiento a -18°C, las pruebas de germinación y viabilidad con TTC mostraron buenos resultados para cada período de tiempo evaluado. Para la conservación en el banco de semillas, las semillas

se colocaron en frascos de vidrio/acero inoxidable transparentes DAGKLAR de 0.4 l. Las etiquetas en los frascos reportaban datos de los lotes de semillas: ubicación del banco de semillas, especie, número de identificación del árbol, año de recolección, cantidad (g), número de semillas, fecha de inicio de la conservación.

4. Final Protocol for *A. nebrodensis* conservation in seed bank (-18°C)



5.3 Conservación del germoplasma en criobanco

La criopreservación, o almacenamiento a temperaturas ultrabajas como las del nitrógeno líquido (-196°C), es la técnica más innovadora para la conservación a largo plazo de los recursos genéticos vegetales. La técnica preserva órganos y tejidos obtenidos de cultivos in vitro y del campo a través de un proceso de ultracongelación que impide casi todos los procesos metabólicos en la célula, preservando su estructura y funcionalidad biológica.

Dispositivo para almacenar muestras a -196°C.

La elección del dewar de nitrógeno líquido, donde almacenar semillas, embriones extraídos, polen y callo embriogénico de *A. nebrodensis*, se basó en la fiabilidad, seguridad, funcionamiento garantizado y bajo consumo de nitrógeno líquido. Se eligió el Locator 8 Plus, comercializado por VWR International Srl de Milán, Italia. Las características destacadas de la cámara climática Locator 8 Plus son las siguientes:

- Contenedor para almacenar muestras (dewar) equipado con monitor de nivel ultrasónico.
- Capacidad de 121 litros.
- 8 estantes por unidad, con capacidad para 10 cajas por estante y 25 crioviales de 2 ml por caja.
- Capacidad total: 2000 crioviales.
- Tasa de evaporación estática: 0.6 L/día.
- Diámetro del cuello: 15.2 cm.
- Diámetro externo x altura: 55.8 x 95.3 cm.
- Equipado con tapa con cerradura.



Fig 5-1 Preparación de las crioboxes que contienen el germoplasma de *A. nebrodensis* (polen, embriones, líneas embriogénicas) para su conservación en el criobanco.

Almacenamiento de embriones a temperatura criogénica (-196°C).

Para la criopreservación, se utilizaron embriones extraídos de semillas maduras esterilizadas, con un contenido de humedad (MC) del 8.9% determinado con un analizador de humedad.

Para realizar el experimento, los embriones se dividieron en dos grupos, uno tratado con solución de vitrificación de plantas (+PVS2) y otro no tratado (-PVS2). Después de la criopreservación, las criocajas se sacaron del nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua (40°C) durante 1 minuto.

Se encontró una tasa de germinación del 90-95% de los embriones tanto para los tratados con la solución PVS2 como para los no tratados. Además, todos los embriones tratados con TTC se tiñeron completamente de rojo después de la recuperación del nitrógeno líquido. Por lo tanto, los resultados destacan el potencial de la tecnología criogénica para la preservación de embriones de *A. nebrodensis*.

Almacenamiento de polen a temperatura criogénica.

La conservación del polen es una herramienta importante para mantener los recursos genéticos de las plantas y puede promover una mayor eficiencia en los programas de reproducción, conservación e intercambio de germoplasma. La conservación del polen debe entenderse como un medio adicional para la conservación del germoplasma vegetal y no como un sustituto de la conservación de semillas o materiales clonales. El éxito de la preservación del polen depende de factores ambientales como el contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento.

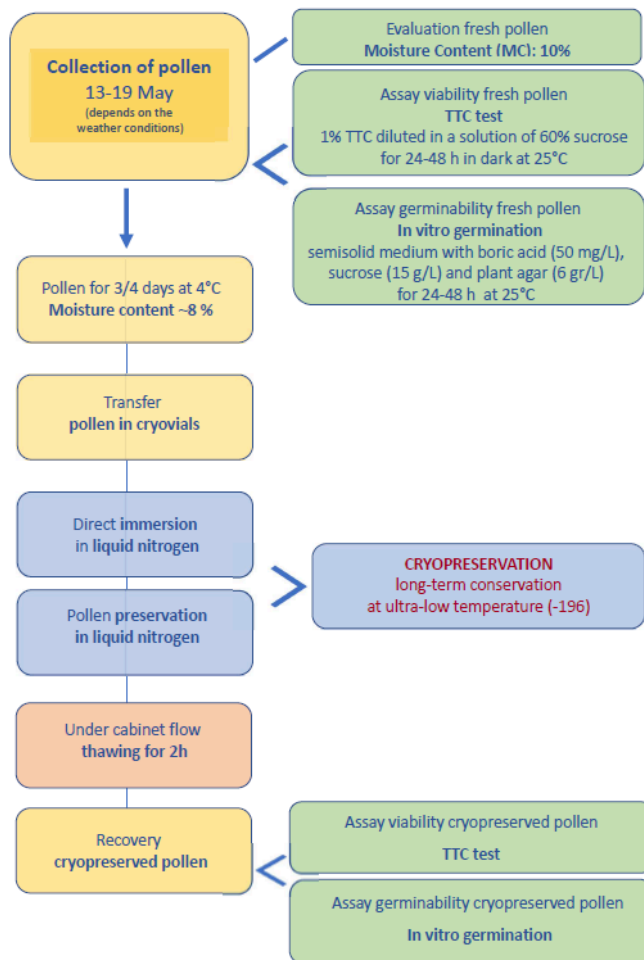
La viabilidad del polen y la tasa de germinación varían con el tiempo en diferentes especies y deben evaluarse antes y después de la criopreservación para verificar el éxito de la conservación. Un contenido de humedad del polen entre el 8% y el 10% previene la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación.

Recolección, morfología y contenido de humedad del polen de *A. nebrodensis*: Las condiciones del campo y la humedad relativa en el momento de la recolección influyen en el contenido de humedad del polen. El polen se recolectó dos veces de varios árboles en mayo de 2020. Después de su extracción, el polen se tamizó y se determinaron su morfología, contenido de humedad (MC), viabilidad y germinación. El contenido de humedad (MC) se determinó con el analizador de humedad en una muestra de 0.2 g de polen, resultando en un promedio del 10%. Posteriormente, el polen se observó utilizando un estereomicroscopio, microscopio óptico y ESEM.

Ensayos de viabilidad y germinación del polen.

Se realizaron pruebas de TTC antes y después de la criopreservación del polen. Se colocaron dos gotas de mezcla de TTC en un portaobjetos de microscopio. El polen de *A. nebrodensis* se espolvoreó, se cubrió con un cubreobjetos y se incubó en la oscuridad durante 24-48 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, cada muestra se observó bajo un microscopio. Los granos de polen que se tiñeron de naranja brillante o rojo se consideraron viables.

5. FINAL PROTOCOL FOR *A. NEBRODENSIS* POLLEN CRYOPRESERVATION



Prueba de germinación in vitro.

El polen germina in vitro al colocar granos de polen en un medio semisólido y medir la elongación del tubo polínico después de unas pocas horas. Los tubos polínicos que alcanzaron una longitud igual al doble del diámetro del grano de polen se consideraron germinados. El medio utilizado para la germinación del polen de *A. nebrodensis* consistió en ácido bórico (50 mg/L), sacarosa (15 g/L) y agar (6 g/L). El polen se mantuvo a 25°C, la temperatura óptima para la prueba de germinación.

Conservación en nitrógeno líquido y evaluación de viabilidad y germinación.

Después de la extracción de los conos, el polen se mantuvo durante tres días a 4°C para reducir el contenido de humedad hasta el 8%. Posteriormente, las muestras de polen se transfirieron a crioviales y se colocaron en criopreservación. Después del almacenamiento en nitrógeno líquido, los crioviales se descongelaron manteniéndolos bajo una campana de flujo laminar durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se transfirieron a placas de Petri. Al aplicar el procedimiento de TTC descrito anteriormente, el porcentaje de granos de polen viables observados osciló entre el 88% y el 96%, sin desviaciones significativas del polen fresco. El mismo resultado se observó en la prueba de germinación, con un porcentaje de granos germinados que osciló entre el 84% y el 94%.

Conservación de callos embriogénicos a temperatura criogénica.

La embriogénesis somática, reconocida como una herramienta avanzada en silvicultura, se aplica desde hace más de tres décadas y se desarrolló inicialmente para especies de coníferas. La aplicación pionera con *Picea* ha demostrado su potencial, evolucionando hasta convertirse en un método beneficioso para especies ecológica y económicamente significativas. La embriogénesis somática se ha aplicado hasta ahora a varias especies del género *Abies*. La combinación de esta técnica con la crioconservación permite la propagación a gran escala y la conservación de los recursos forestales.

Se ha logrado un éxito sustancial en la producción de embriones somáticos de especies de importancia comercial. Sin embargo, en el caso de *A. nebrodensis*, la obtención del callo embriogénico ha resultado difícil.

Protocolo de embriogénesis somática para *A. nebrodensis*.

Se recolectaron conos inmaduros, que contenían semillas en un estado avanzado de embriogénesis, en dos fechas diferentes, a mediados y finales de julio de 2020, mientras que los conos maduros se recolectaron durante la última semana de septiembre de 2020. Inicialmente, la selección de semillas se realizó mediante el procedimiento de rayos X, observando la presencia y morfología de los embriones.

Esterilización de las semillas y extracción de los embriones.

Las semillas se lavaron con detergente durante aproximadamente 30 minutos y, a continuación, se enjuagaron con agua corriente del grifo durante 4 horas. A continuación, las semillas inmaduras se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto, y las semillas maduras durante 5 minutos. A continuación, las semillas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se sumergieron durante 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 20% (v/v) a la que se añadieron unas gotas de Tween 20 y se enjuagaron 3 veces con agua estéril. Bajo una campana de flujo laminar, se retiró la cubierta de las semillas inmaduras y se utilizó el megagametofito como explante. Las semillas maduras se sumergieron en agua estéril durante 48 horas y, a continuación, se extrajeron cuidadosamente los embriones cigóticos utilizando pinzas estériles.

Inducción y proliferación de callos a partir de embriones maduros.

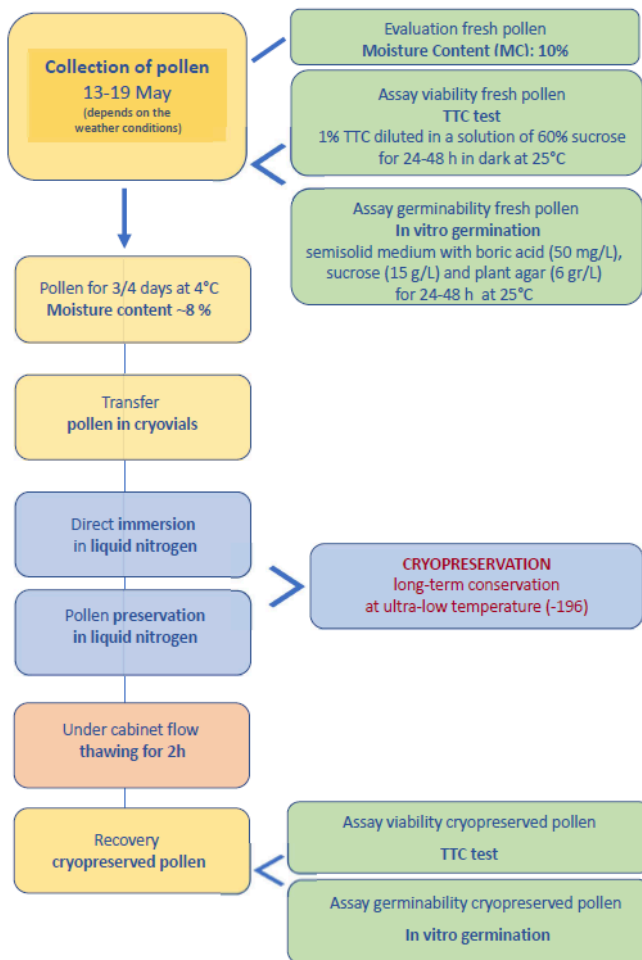
Se extirparon embriones maduros y se cultivaron horizontalmente en diferentes medios de cultivo para la inducción de callos. Se extrajeron embriones de semillas maduras y se colocaron horizontalmente en placas de Petri. Por primera vez en esta especie se obtuvo callo embriogénico, utilizando sustrato SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) con

citoquinina (BAP, 1 mg/L). Tras 2 semanas de incubación en sustrato de inducción en la oscuridad, el callo desarrollado se separó del embrión y se transfirió a un sustrato fresco para su proliferación, tratando cada callo como una línea celular individual. Como sustrato de proliferación se utilizó SH suplementado con 4,27 μM de ABA, PEG-4000, 8% y 4% de maltosa. El tejido embriogénico (TE) se mantuvo en la oscuridad a 25 °C y se subcultivó en sustrato fresco cada 15 días. Tras obtener una cantidad suficiente de TE, las líneas celulares individuales se transfirieron a un sustrato de maduración (SH con 10 mg/L de ácido abscísico, 8% de polietilenglicol y 40% de maltosa). Los cultivos se mantuvieron a 25°C, en la oscuridad, subcultivando cada 2 semanas. La formación de TE se observó continuamente bajo el estereomicroscopio, junto con el desarrollo de embriones somáticos.

Encapsulación y criopreservación de callos embriogénicos.

Se encapsularon pequeños trozos (0,5 g) de callo embriogénico en esferas de alginato siguiendo el protocolo de Micheli y Standardi (2016). Posteriormente, se lavaron con agua destilada esterilizada y se sumergieron en una solución de alginato de sodio al 3% (p/v). A continuación, las gotas de matriz encapsulante que contenían ET se transfirieron durante 20 minutos a medio basal MS suplementado con 11,1 mg L⁻¹ de cloruro cálcico para obtener cápsulas de ET. Para la criopreservación, tras lavarlas en agua estéril, las perlas se trataron con la solución de carga y se transfirieron a una solución líquida que contenía medio MS suplementado con 34,2% de sacarosa. Posteriormente, las cápsulas con ET se trataron con Solución de Vitricación Vegetal 2 (PVS2) a 0 °C. A continuación, todas las cápsulas con ET se sumergieron en nitrógeno líquido. Tras la criopreservación, las cápsulas ET se descongelaron en un baño de agua (2 min a 40 °C) y se transfirieron a medio SH suplementado con 4,43 μM de BAP (el mismo medio utilizado para la proliferación) para comprobar su viabilidad.

5. FINAL PROTOCOL FOR *A. NEBRODENSIS* POLLEN CRYOPRESERVATION



6. REPOBLACIÓN CON PLÁNTULAS SELECCIONADAS

Uno de los principales objetivos del proyecto es crear nuevos núcleos de repoblación utilizando plantones seleccionados de *A. nebrodensis* obtenidos a partir de polinizaciones cruzadas.

La selección de los lugares en los que establecer las nuevas plantaciones tuvo en cuenta los resultados obtenidos en las plantaciones realizadas en los proyectos anteriores. Se realizaron inspecciones en todo el Parque de Madonie para identificar los sitios caracterizados por unas características ecológico-ambientales adecuadas y que han dado buenos resultados. Los lugares seleccionados se encuentran en el Parque Regional de Madonie, principalmente entre 1100 y 1600 m de altitud, en los municipios de Polizzi Generosa, Isnello, Petralia Soprana, Petralia Sottana, Geraci Siculo y Gratteri. Todos los lugares se encuentran en zonas gestionadas por el Departamento de Desarrollo Agrícola y Territorial de la Región. Los lugares situados entre 1100 y 1400 m de altitud forman parte del clímax *Ilex aquifolii-Quercetum austrotyrrhenicae*, una asociación forestal relictica de notable interés geobotánico asentada sobre los sustratos cuarzo-areníticos. Los lugares situados por encima de los 1400 m se sitúan en la franja altimétrica de los hayedos, ligados a la asociación clímax *Geranium versicoloris-Fagion*.

Algunos sitios (Quacella, Piano Formaggio, Favarotti), a pesar de estar situados sobre un sustrato calcáreo, presentan un suelo profundo y descalcificado. Se caracterizan potencialmente por rasgos de vegetación atribuibles a la encina mesófila (*Quercetum ilicis*), asociación caracterizada por la presencia de *Ilex aquifolium* y algunas especies de árboles caducifolios. Los dos lugares seleccionados a 750-850 m de altitud se justifican por la consideración de que *A. nebrodensis* creció en el pasado en lugares más bajos que la población residual actual, restringida a zonas poco accesibles entre 1400 y 1600 m de altitud.

La mayoría de los sitios tienen una exposición N-NW y están total o parcialmente cubiertos por plantaciones forestales de coníferas como *Pinus nigra*, *Cedrus atlantica*, con la participación de árboles de hoja ancha como *Q. petraea*, *F. sylvatica*, *Q. ilex*, *Fraxinus ornus*, *Ilex aquifolium*, *Acer campestre*, o *Q. ilex*. La presencia de una capa de cobertura es esencial en el crecimiento juvenil de *A. nebrodensis*, ya que evita la luz solar directa.

La plantación se realizó siguiendo las curvas de nivel y la pendiente del terreno. Para que las plantas jóvenes crecieran correctamente, se mantuvo un espaciado adecuado, evitando al mismo tiempo un trazado geométrico. Cuando fue necesario, se eliminó la capa herbácea, procurando no dañar las especies raras y/o endémicas presentes. De acuerdo con los objetivos del proyecto LIFE4FIR, las parcelas individuales tienen una superficie de 3000 a 4000 m² y en cada una de ellas se han plantado 400 plántulas. Para la creación de las parcelas individuales, las intervenciones se llevaron a cabo en las siguientes fases: instalación de las vallas, apertura de los hoyos, plantación de especies leguminosas mejorantes, plantación de plántulas de *A. nebrodensis*.

Vallado.

Se instalaron vallas a lo largo del perímetro de cada zona, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las vallas instaladas para proteger los árboles de la población natural. Se utilizaron postes de castaño con un diámetro de 8-10 cm y una longitud de 2,40 m, insertados en el suelo unos 40 cm y colocados a una distancia de 2 m entre sí.

La altura de las vallas es de aproximadamente 2 m por encima del suelo. Cuatro capas de alambre galvanizado ancladas a los postes se fijaron a una malla metálica progresiva de 1,65 m de altura y a un alambre aéreo. Se permitirá el acceso a las parcelas mediante puertas de 1,5 m de ancho y 1,80 m de alto. Una vez instaladas, las verjas se sujetarán mediante polainas de hierro ancladas a los postes de castaño.

Excavación de hoyos.

La apertura de los hoyos se realizó tanto con dispositivos mecánicos como con equipos agrícolas específicos. Los hoyos no tendrán un patrón de espaciado bien definido, sino que se excavarán en función de las características de la superficie y, por lo general, se espaciaron entre 3 y 4 metros. Para garantizar a las jóvenes plántulas de *A. nebrodensis* un desarrollo armonioso del sistema radicular y una mayor reserva de agua, los hoyos tenían forma troncocónica o piramidal. Ambos tenían una anchura inferior de unos 80 cm y una anchura superior de unos 50 cm, con una profundidad de entre 50 y 60 cm.



Fig 6-1 Una cerca recién instalada alrededor de una de las parcelas preparadas para la repoblación de *A. nebrodensis*.

Plantación de leguminosas mejorantes.

La plantación simultánea de arbustos pertenecientes a la familia de las fabáceas tiene por objeto mejorar la fertilidad del suelo y garantizar una protección adecuada de la plántula de *A. nebrodensis* contra la luz solar excesiva, el calor y la sequía estival después de haber sido trasplantada. Los arbustos fijadores de nitrógeno de crecimiento rápido ayudan a mantener unas condiciones microclimáticas adecuadas para el desarrollo de la plántula de *A. nebrodensis* en el periodo primavera-verano y a protegerlas de los fuertes vientos. Los arbustos utilizados pertenecen a los géneros *Genista*, *Spartium* y *Cytisus*. Tenían 2-3 años y se plantaron a una distancia de unos 50 cm de cada plántula de *A. nebrodensis*. Por lo general, se plantarán dos arbustos por cada plántula de *A. nebrodensis*.



Fig 6-2 Una planta joven de *A. nebrodensis* está siendo trasplantada.

Plantación de plántulas de *Abies nebrodensis*.

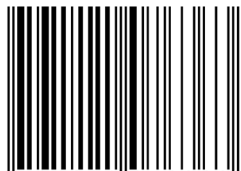
En cada parcela se han plantado 400 plántulas de unos 3 años criadas en contenedores de 9x9x20 cm en el vivero. Estas plántulas se trasplantaron al cabo de 1 año y se sometieron a micorrización. La plantación, como ya se ha dicho, no siguió una disposición geométrica, sino que se realizó en función de la morfología del suelo y conforme a la vegetación asentada. Donde había una cubierta arbórea, las plántulas se plantaron en la cara norte de los troncos. En las zonas reforestadas con un espaciamiento geométrico de los árboles, las plántulas de *A. nebrodensis* se dispusieron siguiendo un patrón de quincunce. Durante la plantación, se añadió abono orgánico rico en fósforo para sostener las plántulas trasplantadas. Tras la plantación, se creó una hondonada en el suelo alrededor de cada planta para favorecer la acumulación de agua. Además, para reducir la evaporación, en primavera se realizó un acolchado con material vegetal obtenido de las especies herbáceas presentes en las inmediaciones de las parcelas.

Dentro de las parcelas también se cavaron unos 50 hoyos de 40x40x40 cm para la siembra directa de semillas de *A. nebrodensis*, colocando cada semilla a unos 3 cm de profundidad. Se sembraron cinco semillas por hoyo.

Año de publicación **2024**



ISBN 979-12-210-7636-3



9 791221 076363