



LIFE4FIR
Manuale con indicazioni operative,
protocolli e procedure



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



LIFE4FIR è un progetto cofinanziato con un contributo dello strumento finanziario LIFE dell'Unione Europea

AUTORI

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

INDICE

1. ANALISI GENETICHE PER GESTIRE LA CONSERVAZIONE DI <i>ABIES NEBRODENSIS</i>	6
2. INCREMENTO DELLA VARIABILITÀ GENETICA IN <i>A. NEBRODENSIS</i>	11
3. PRODUZIONE OTTIMIZZATA DI PIANTINE SELEZIONATE IN VIVAIO	14
4. MISURE DI SOSTEGNO AL POPOLAMENTO NATURALE	20
5. MISURE DI CONSERVAZIONE EX SITU	28
6. RIPOPOLAMENTO IN NUCLEI DI RE-DIFFUSIONE CON PIANTINE SELEZIONATE	43

1. ANALISI GENETICHE PER GESTIRE LA CONSERVAZIONE DI *ABIES NEBRODENSIS*

Una delle attività principali del progetto LIFE4FIR è stata la valutazione della variabilità genetica e delle relazioni genetiche tra i 30 alberi adulti e le 118 piantine della popolazione naturale di *Abies nebrodensis*. La conoscenza di questi aspetti è fondamentale per la conservazione della specie attraverso una gestione attiva basata su un programma di incroci controllati.

La genotipizzazione con SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) è stata utilizzata per eseguire la caratterizzazione genetica sia degli alberi adulti che della popolazione naturale. Sulle piantine sono stati poi effettuati test di paternità per determinare il tasso di esoincrocio (incrocio tra individui non imparentati), consanguineità e autofecondazione e per valutare il tasso di introgressione (eventuale ibridazione) dovuto alla fecondazione di coni femminili con polline proveniente specie da abete non native (*Abies alba* e *Abies cephalonica*) presenti in piantagioni realizzate nel Parco delle Madonie. Le fasi seguite per raggiungere gli obiettivi di questa azione sono qui sotto dettagliate.

1.1 Selezione di SNPs informativi

SNPs informativi e di alta qualità sono stati identificati attraverso sequenziamento del DNA associato a siti di restrizione (RAD-Seq). Per la genotipizzazione con SNPs è stata utilizzata la tecnologia OpenArrays (ThermoFisher Inc., Stati Uniti). Sulla base di dati genomici precedenti, è stato sviluppato un pannello di 120 SNPs per la genotipizzazione di individui di *A. nebrodensis*. Di questi, 20 SNPs sono stati selezionati per il loro potere di discriminare presunti ibridi tra *A. nebrodensis* e le altre due specie di *Abies* (*A. alba* e *A. cephalonica*) attraverso una PCoA (analisi delle coordinate principali).

I restanti 100 SNP sono stati selezionati per analizzare la struttura genetica della popolazione e per i test di paternità.

1.2 Genotipizzazione di *A. nebrodensis*, analisi della diversità e della struttura genetica della popolazione naturale.

Sono stati campionati tutti gli alberi maturi ($n=30$) e gli individui giovani di età superiore a 5 anni ($n=118$) della popolazione naturale di *A. nebrodensis*, raccogliendo alcuni aghi. Tutti questi campioni sono stati conservati in gel di silice fino alle successive estrazioni del DNA. Struttura della popolazione. La suddivisione della popolazione in *A. nebrodensis* è stata studiata con l'Analisi Discriminante delle Componenti Principali (DAPC), eseguita utilizzando il pacchetto "adegenet" del software R v.4.0.3.

Grado di consanguineità. Sulla base del pedigree stimato, è stato valutato il coefficiente di consanguineità (F_{is}) della popolazione utilizzando il software COLONY. Inoltre, è stata stimata la dimensione effettiva della popolazione (N_e), che è un parametro chiave nella genetica delle popolazioni che calcola il numero di individui che effettivamente contribuiscono a creare prole nella generazione successiva.

Diversità genetica. La diversità genetica degli alberi adulti è stata valutata calcolando i coefficienti: P_{Ht} (proporzione di loci eterozigoti in un individuo), H_s (eterozigosità standard basata sull'eterozigosità media attesa), I_R (grado di parentela), H_L (omozigosità per locus) e I_{NBR} (coefficiente di consanguineità). Questi coefficienti riflettevano principalmente la moderata omozigosità delle piante di *A. nebrodensis* dovuta alla consanguineità e all'autofecondazione.

Relazione genetica. È stato calcolato lo stimatore Ritland (RIT) della co-ascendenza a coppie di individui, per conoscere il grado di parentela genetica degli alberi della popolazione di *A. nebrodensis*. Per la gestione genetica della popolazione, sono stati individuati le combinazioni d'incrocio con valori RIT più negativi ed è stato riportato un elenco dei 30 incroci consigliati tra alberi maturi di *A. nebrodensis*. Queste indicazioni sono state seguite per aumentare la variabilità genetica nelle prole attraverso incroci controllati.

	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

Tabella 1-1. Stime della diversità genetica degli alberi adulti. Pht (proporzione di loci eterozigoti in un individuo) Hs (eterozigosità standardizzata basata sull'eterozigosità attesa media) IR (correlazione interna) HL (omozigosità per locus) e INBR (coefficiente di inincrocio). I colori dei coefficienti variano da valori inferiori (blu scuro) a valori superiori (giallo).

1.3 Test di paternità sulle piantine della rinnovazione

Sono stati effettuati test di paternità sulle piantine della rinnovazione naturale per determinare il tasso di esoincroci, consanguineità e autofecondazione e per valutare l'eventuale ibridazione dovuta a polline proveniente da specie di *Abies* non autoctone. Utilizzando il software COLONY v. 2.0.6.6, i test di paternità hanno consentito di dedurre l'origine di tutte le piantine campionate.

Per alcune piantine è stato dedotto solo uno dei genitori della popolazione e di conseguenza sono state considerate come ibridi putativi con altre specie di *Abies*. Per far luce sulla possibile origine ibrida di questi individui, è stata effettuata un'analisi delle componenti principali (PCA) utilizzando 95 loci presenti in *A. nebrodensis*, *A. cephalonica* e *A. alba*. Ciò ha consentito di verificare geneticamente i potenziali ibridi in base alla loro vicinanza alle tre specie di abeti.

1.4 Caratterizzazione genetica delle piante del locale vivaio

Le giovani piante in crescita nel locale vivaio forestale hanno rappresentato la prima fase di selezione del materiale da utilizzare per la riforestazione all'inizio del progetto. È stato quindi importante saggiare la loro origine genetica effettuando test di paternità, similmente a quanto fatto con le piantine della rinnovazione naturale. La genotipizzazione con SNPs è stata utilizzata per la caratterizzazione genetica di 2064 giovani individui di *Abies nebrodensis* provenienti dal vivaio locale, progenie da libera impollinazione di 8 piante madri. I test di paternità sono stati effettuati utilizzando il software COLONY. Il livello di consanguineità delle piantine analizzate è stato stimato calcolando il coefficiente di consanguineità (F_{is}). È stata inoltre calcolata la dimensione effettiva della popolazione (N_e) per stimare il numero di individui che contribuiscono effettivamente a creare la discendenza nella generazione successiva. Questi risultati sono stati di riferimento per la selezione delle piantine del vivaio da impiegare nei nuovi nuclei di rimboschimento e per la conduzione di un programma di incroci controllati per produrre piantine con maggiore variabilità genetica.

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)

Tabella 1-2. Risultati della caratterizzazione genetica delle 2064 giovani piante di *Abies nebrodensis* campionate nel vivaio locale Piano Noce.

2. INCREMENTO DELLA VARIABILITÀ GENETICA IN *A. NEBRODENSIS*

Popolazioni piccole e isolate rischiano l'estinzione a causa della depressione da consanguineità, della perdita casuale di variazioni benefiche e della ridotta adattabilità ai cambiamenti ambientali. La diminuita variabilità genetica, può infatti tradursi in una ridotta capacità di adattamento delle popolazioni alle nuove sfide proposte dal loro ambiente, quali malattie infettive o il cambiamento climatico.

Il soccorso genetico è aumento delle dimensioni della popolazione attraverso il movimento di nuovo materiale genetico da una popolazione a un'altra. Ciò può avvenire attraverso l'intervento assistito dall'uomo o la migrazione naturale. Come strumento di conservazione, questa strategia può aumentare la diversità genetica di popolazioni piccole e isolate e aiutarle a riprendersi dalla consanguineità. Nel caso di *Abies nebrodensis* la frammentazione della popolazione e l'isolamento delle piante favorisce l'autofecondazione con effetti deleteri per la progenie e le possibilità evolutive della specie.

Un programma di incroci controllati è stato sviluppato per promuovere l'incrocio tra piante isolate e favorire la creazione di nuove combinazioni genetiche. Gli incroci dovrebbero prendere in considerazione fattori come l'incremento della fitness riproduttiva in termini di allegagione, numero di semi, tasso di germinazione e sopravvivenza delle piantine poichè l'impollinazione libera porta principalmente all'autofecondazione.

2.1 Esecuzione di incroci controllati

Monitoraggio e valutazione dell'inizio della fioritura. Nel popolamento naturale di *A. nebrodensis* la fioritura avviene generalmente all'inizio di maggio. Per cui dalla seconda metà di aprile gli alberi adulti *A. nebrodensis* vanno monitorati seguendo l'apertura delle gemme fiorali e lo sviluppo delle strutture riproduttive fino alla piena fioritura. La fioritura avviene in modo scalare anche in base all'altitudine ed, inoltre è molto irregolare da un anno all'altro. In genere una fioritura abbondante (pasciona) si registra ogni 4 anni, intercalati da anni in cui la produzione di fiori è scarsa o del tutto assente e anni in cui è parziale (poco abbondante).

Isolamento dei coni femminili.

Prima dell'apertura dei coni maschili e della emissione del polline, i coni femminili sono stati isolati con dei sacchetti in terilene, un materiale cartaceo speciale idrofobo, ma che allo stesso tempo consente la traspirazione. I sacchetti sono stati chiusi alla base utilizzando del nastro di gomma morbida.



Fig 2-1 Isolamento delle pigne femminili con speciali sacchetti di terylene per effettuare incroci controllati.

Raccolta dei coni maschili maturi.

Coni maschili maturi (e prossimi alla fioritura) sono stati raccolti separatamente dai singoli alberi del popolamento e conservati in sacchetti di carta fino al loro utilizzo sui coni femminili.

Somministrazione del polline.

All'inizio dell'apertura dei coni femminili, i sacchetti sono stati aperti per l'inserimento dei coni maschili maturi al loro interno, separatamente in base alla combinazione d'incrocio. In genere vengono inseriti 10-15 coni maschili per ogni cono femminile. Il naturale movimento del sacchetto dovuto al vento favorisce la dispersione del polline dai coni all'interno del sacchetto permettendo l'impollinazione dei coni femminili.

Combinazioni d'incrocio.

Gli appaiamenti sono stati eseguiti in base ai risultati ottenuti dalla pairwise co-ancestry tra le piante del popolamento naturale, con l'obiettivo di favorire gli incroci tra piante con maggiore distanza genetica. Nel 2020, utilizzando 174 sacchetti sono state eseguite 27 combinazioni parentali, mentre nel 2022 sono state eseguiti 23 combinazioni d'incrocio utilizzando 121 sacchetti. Lo sviluppo di coni all'interno dei sacchetti è stato monitorato durante l'estate a intervalli di 15 giorni.

Raccolta dei coni e del seme.

La maturazione dei coni è avvenuta regolarmente e i sacchetti sono stati rimossi alla fine di settembre per raccogliere i coni prima della loro disarticolazione ed estrarre i semi in Ottobre.

3. PRODUZIONE OTTIMIZZATA DI PIANTINE SELEZIONATE IN VIVAIO

Una delle azioni centrali del progetto LIFE4FIR è la produzione di semenzali dal seme selezionato ottenuto con gli incroci controllati e l'allevamento in condizioni ottimali delle piantine nel vivaio in modo da ottenere materiale vigoroso e migliorato da utilizzare per la realizzazione di nuovi nuclei di ripopolamento. Per perseguire questo obiettivo sono state eseguite una serie di attività e misure diversificate.

3.1 Valutazione delle condizioni di crescita delle piante in vivaio Ispezione fitosanitaria.

Nel vivaio forestale adibito alla produzione delle nuove piantine, all'inizio del progetto è stata condotta un'indagine fitosanitaria. Per ogni lotto, pianta madre, anno di semina le piantine sono state sottoposte ad ispezione visiva, registrando il tasso di mortalità e i diversi tipi di sintomi osservati, la loro frequenza e l'impatto (porzione di chioma danneggiata). Questo ha portato ad ottenere un quadro delle dimensioni di ogni progenie e della frequenza dei sintomi osservati tra e all'interno delle progenie.

	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

Tabella 3-1. Impatto (in numero e percentuale) dei principali sintomi osservati nella parte aerea delle giovani piante allevate nei tre settori del vivaio.

Campionamento e analisi della presenza di patogeni.

In presenza di alterazioni della chioma, campioni di aghi e rametti sono stati prelevati dalle piantine sintomatiche per ulteriori osservazioni in laboratorio. I campioni sono stati accuratamente controllati per definire in dettaglio i segni di colonizzazione da parte di agenti patogeni

(reazione dei tessuti, corpi fruttiferi di funghi, ecc.) e per l'isolamento in vitro di microrganismi fungini. Gli isolamenti sono stati eseguiti da aghi (arrossati, completamente o parzialmente necrotizzati) e da germogli disseccati, dopo sterilizzazione superficiale. I campioni sono posti su substrato agarizzato (PDA, Patate Destrosio Agar). Le colonie ottenute sono state raggruppate in morfotipi in base alle loro caratteristiche colturali. I morfotipi sono stati identificati attraverso il sequenziamento di specifiche regioni di DNA genomico utilizzando i primer ITS1 e ITS4.



Fig 3-1 Sintomi di aghi arrossati e avvizziti osservati nelle giovani piante di *A. nebrodensis* allevate nel vivaio locale.



Fig. 3-2 Colonie fungine cresciute su piastre PDA isolate da aghi affetti raccolti nel vivaio.

Valutazione della presenza di agenti patogeni del suolo.

Il substrato delle piante in vaso può ospitare microrganismi patogeni (funghi, batteri, nematodi) e l'azione di oomiceti del suolo molto pericolosi, come *Phytophthora* sp, non può essere trascurata in ambiente vivaistico. Questo oomicete attacca il sistema radicale delle piante causando deterioramento generalizzato della parte epigea (crescita stentata, clorosi, defogliazione). Particolare attenzione dovrebbe essere prestata quando i sintomi del declino e della morte si diffondono in un'area o in un appezzamento del vivaio, colpendo molte piante contigue. Per questo motivo è opportuno che i campioni di suolo e di radici prelevati dai vasi delle piante sintomatiche vengano analizzati. La presenza di *Phytophthora* sp. può essere determinata attraverso i

metodi tradizionali che usano un'esca per l'isolamento diretto dal suolo, dai detriti organici e dalle radici. La sua identificazione può essere realizzata con amplificazione e sequenziamento del locus ITS.

Parametri ecofisiologici e irrigazione.

Per ottimizzare l'irrigazione delle piante lo studio delle relazioni idriche (componenti del potenziale idrico xilematico delle piante) permette di stabilire il tipo di strategia che la pianta adotta per rispondere al deficit idrico e, contestualmente, individuare degli indicatori semplici ed efficaci da utilizzare per la gestione della risorsa idrica. Le curve pressione-volume (P-V) permettono di descrivere la relazione tra il potenziale idrico totale (Ψ_t) e le sue componenti in funzione del contenuto idrico relativo (R) degli organismi viventi. Questi parametri aiutano a stabilire la corretta quantità di acqua da somministrare e la modalità di somministrazione.

Analisi del substrato di crescita.

Le analisi chimico-fisiche di campioni di terreno permettono di verificare le caratteristiche della miscela utilizzata per la germinazione e la coltivazione in vaso delle piante e valutare alterazioni rispetto all'optimum della specie. I parametri di pH; conducibilità elettrica (EC); materia organica e contenuto totale di carbonato permettono di definire le proprietà del terreno. I campioni di terreno prelevati dalle piante in vaso nel vivaio Piano Noce sono risultati variare soprattutto nei livelli di salinità (CE) e nel contenuto totale di carbonato. È emersa quindi la necessità di utilizzare un substrato di crescita standardizzato e ottimizzato per *A. nebrodensis*.

3.2 Misure per migliorare la germinazione e la sopravvivenza delle piantine

Selezione dei semi pieni.

Attraverso l'impiego di un dispositivo a raggi X (Gilardoni radiolight) è stata sviluppata una procedura per selezionare i semi pieni. Nei semi ottenuti da libera impollinazione raccolti nel 2020 da 11 alberi adulti

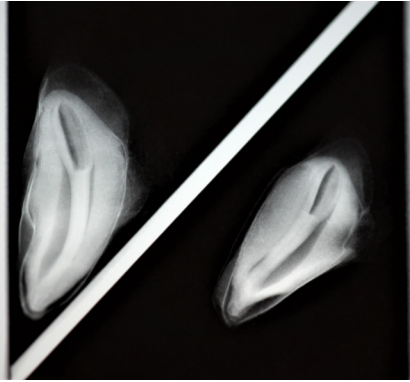


Fig 3-3 Semi pieni sani (con embrione all'interno) di *A. nebrodensis* fotografati ai raggi X.

della popolazione naturale di *A. nebrodensis*, la percentuale di semi pieni variava dallo 0 (ottenuta per l'albero n. 19) al 54% (ottenuta per l'albero n. 7) con un valore medio stimato del 31,7%. L'impiego dei soli semi pieni permette di aumentare significativamente il tasso di germinazione.

Impiego di un substrato standardizzato.

È stato sviluppato un sistema di coltivazione in vaso di *A. nebrodensis* che tenesse conto di parametri fisici e chimici standardizzati in grado di migliorare sia la germinazione dei semi che la crescita delle piantine. Tra i diversi substrati testati, i risultati migliori sono stati ottenuti con il terreno Vigorplant completo, addizionato con Agriperlite (nel rapporto 70 lt + 10 lt) (Fig. 7), con il quale è stata osservata una percentuale di germinazione variabile dal 20% all'80% tra i lotti di semi delle diverse piante madri, con una media del 31,4%.

Impiego di vassoi di semina.

Questo tipo di contenitore presenta alcuni vantaggi: maneggevolezza in vivaio, buona germinazione, elevata densità di piante per unità di superficie, ridotta richiesta di spazio e, soprattutto, minore stress da trapianto per i semenzali. Quest'ultimo aspetto è di fondamentale importanza, in quanto oltre il 90% delle perdite in vivaio avvengono subito dopo il trapianto. L'estrazione dalle fitocelle provoca infatti frequenti rotture del fittone con conseguente morte delle piantine. La semina in vassoi evita questo tipo di problema in quanto l'apparato

radicale delle piantine viene estratto con tutto il pane di terra e rimane intatto.

Micorrizzazione.

Il Basidiomicete *Pisolithus tinctorius* (Pers.), noto come simbionte ectomicorrizico in *A. alba* e *A. chephalonica*. Le piantine di un anno sono state inoculate in Dicembre al momento del trapianto, utilizzando 20 ml di una sospensione di spore di *P. tinctorius* alla concentrazione di 107 spore / ml per pianta. Le piantine sono state trasferite in serra e regolarmente irrigate per accelerare la colonizzazione fungina. Alla fine dell'estate successiva è stata effettuata la valutazione dell'efficacia della micorrizzazione. In media, le piantine inoculate risultavano più alte di quelle non inoculate (circa 1,5 cm di differenza), con un colletto radicale più spesso (2 mm vs. 1 mm) e un IM più alto (7,84 vs 6,25). Anche il peso secco delle piantine inoculate (sia la parte epigea che l'apparato radicale) è risultato 2-3 volte maggiore rispetto ai controlli non inoculati.

Le piantine di un anno sono state trapiantate dal vassoio di



Fig 3-4 Dopo essere state trapiantate, le piantine sono state trattate con una sospensione del fungo micorrizico *Pisolithus arhizus*.

germinazione prelevando anche tutto il pane di terra e sono state trasferite in vasi 8 x 12 cm contenenti lo stesso substrato di crescita (Vigorplant + agriperilte). Le piantine sono state mantenute nel nuovo contenitore per almeno un altro anno fino alla loro messa a dimora nelle parcelle di ripopolamento. Alla fine dell'estate successiva è stata effettuata la valutazione dell'efficacia della micorrizzazione. Le piantine inoculate hanno mostrato aghi di colore verde intenso e migliore sviluppo vegetativo, con produzione dei primi getti laterali, rispetto alle piantine non inoculate. In media, le piantine inoculate erano più alte di quelle non inoculate (differenza di circa 1,5 cm), con un colletto radicale più spesso (2 mm contro 1 mm) e un MI (indice di micorrizzazione) più alto (7,84 contro 6,25). Anche il peso secco delle piantine inoculate (sia della parte epigea che dell'apparato radicale) è risultato 2-3 volte maggiore di quello dei controlli non inoculati.

4. MISURE DI SOSTEGNO AL POPOLAMENTO NATURALE

4.1 Monitoraggio e rilievi fitosanitari.

La valutazione e il monitoraggio dello stato di salute della popolazione naturale forniscono conoscenze utili sui disturbi che si verificano e possono aiutare a gestire adeguate misure di protezione e conservazione. L'ispezione fitosanitaria della popolazione di *A. nebrodensis* è una delle misure fondamentali per valutare lo stato di salute degli alberi.. Il monitoraggio delle condizioni sanitarie mediante indagini periodiche ha anche lo scopo di valutare l'effetto delle misure di protezione che saranno attuate nel corso del progetto.

Ispezioni alle chiome.

Gli alberi sono stati sottoposti annualmente ad un attento esame visivo per valutarne lo stato di salute sulla base di osservazioni sulla forma della chioma e la trasparenza, il cambiamento di colore del fogliame, la presenza di parti deperienti, essiccate o danneggiate, il verificarsi di lesioni. I disturbi osservati sulle chiome sono stati descritti registrando il tipo di organo interessato (tronco, rami, ramoscelli, germogli, aghi), la porzione della chioma coinvolta, idealmente divisa in tre parti lungo l'asse longitudinale (inferiore, intermedio e terzo superiore), la direzione (nord, sud, est e ovest), l'impatto in termini di percentuale di chioma danneggiata e numero di rametti secchi o arrossati per unità di superficie. I rilievi sulle alterazioni delle chiome sono stati messi in relazione con le condizioni microambientali e stagionali dei siti ove gli alberi sono ubicati.



Fig 4.1 Chioma di un albero di *A. nebrodensis* che mostra aghi arrossati, caduta degli aghi e germogli avvizziti.

Campionamenti e isolamenti fungini.

Nel popolamento naturale dagli alberi che mostravano alterazioni della chioma, sono stati campionati rametti che mostravano arrossamento degli aghi. Sono stati inoltre raccolti rametti sani che non presentavano sintomi, adiacenti a quelli sintomatici. Dieci aghi sono stati staccati da ciascun rametto per l'isolamento dei funghi. Dopo sterilizzazione superficiale con una soluzione di etanolo al 70% (1 min) e una di ipoclorito di sodio al 4-5% di cloro attivo (4 min), i campioni sono stati poi risciacquati con acqua sterile e asciugati con carta assorbente sterile, e quindi posti su substrato agarizzato (PDA, Patate Destrosio Agar). Complessivamente, per gli isolamenti sono stati utilizzati 250 aghi arrossati e 250 verdi (sani). Le colonie ottenute sono state raggruppate in morfotipi in base alle loro caratteristiche morfologiche. La frequenza di isolamento (IF) è stata calcolata come percentuale del numero totale di frammenti piastrati. Per l'identificazione dei taxa fungini (DNA barcoding), sono stati utilizzati 1-3 isolati di ciascun morfotipo per l'estrazione del DNA. Per il sequenziamento sono stati utilizzati i primer ITS1 e ITS4. Le sequenze risultanti sono state confrontate per l'identificazione con le sequenze disponibili da GenBank utilizzando lo strumento online Blast.

4.2 Rilievi multispettrali con drone.

Gli stress biotici o abiotici agiscono sulla fisiologia e biochimica degli alberi con conseguente modificazione della radiazione assorbita o riflessa dalla chioma. La riflettanza spettrale si basa sull'assorbimento esercitato dall'acqua e dalla clorofilla nella foglia. Sono state rilevate varie gradazioni di colore della vegetazione dovute al tipo, salute, struttura di foglia e contenuto di umidità delle piante. Attraverso telecamere multispettrali si può misurare la radiazione visibile e infrarossa riflessa dalle piante.

Rilievi con droni sono stati effettuati sul popolamento naturale di *A. nebrodensis* all'inizio e alla fine del progetto. Nel rilievo sono state utilizzate due fotocamere: 1) fotocamera convenzionale RGB per realizzare un'ortofoto del terreno e un modello digitale per trovare correlazioni tra i tratti topografici e le sollecitazioni ambientali; 2)

telecamera multispettrale per ottenere 4 immagini simultanee per ogni banda (rosso, red edge, verde, vicino infrarosso). Utilizzando queste immagini, sono state create mappe di riflettanza dalla cui combinazione possono essere ottenuti diversi indici di vegetazione. Le immagini multispettrali sono state adeguatamente analizzate per la produzione di una mappa NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), cioè di un indicatore che descrive l'intensità e la distribuzione del verde, la densità relativa e la salute della vegetazione per ogni elemento dell'immagine, o pixel, in un'immagine ottenuta con drone. Le mappe multispettrali permetteranno di monitorare l'evoluzione nel tempo dello stato di salute degli alberi in funzione delle fluttuazioni climatiche e delle misure di conservazione che verranno attuate nel frattempo.

4.3 Sostegno alla rinnovazione naturale.

Vari fattori limitano la crescita e l'insediamento della rinnovazione naturale della popolazione di *A. nebrodensis*: i suoli superficiali e rocciosi, la fioritura e la fruttificazione irregolari nel corso degli anni, l'alto tasso di autofecondazione e l'alta percentuale di semi vuoti, l'impatto degli erbivori selvatici che danneggiano le piantine. La rinnovazione naturale si insedia principalmente tra gli arbusti di ginepro a cuscino e di ginestra, sotto la copertura dei faggi o in presenza di uno strato di muschio, dove trovano condizioni microclimatiche favorevoli e protezione dai morsi degli erbivori.

Censimento e mappatura della rinnovazione.

Il rilievo delle giovani piante è stato effettuato per tracciare e monitorare l'evoluzione della rinnovazione naturale. È stato sviluppato un protocollo di indagine basato sulla misurazione della distanza in metri e dell'angolo di azimut tra ogni pianta o piantina e albero madre più vicino, attraverso l'uso di una bussola professionale.

Sono state preparate tabelle di rilevamento contenenti i parametri da registrare: numero

dell'albero madre (MP) e posizione con GPS, Id della piantina, distanza da MP, azimut, altezza (cm), età, stato vegetativo e di salute, eventuali note. I dati raccolti sono stati utilizzati per l'implementazione di una

banca dati completa e 15 mappe, una per ogni pianta madre. Non sono più stati utilizzati picchetti con etichette per segnalare le giovani piante. Infatti, quelli utilizzati nelle indagini precedenti, sembrano attrarre gli erbivori selvatici e sono stati staccati e masticati dai cervi in breve tempo dopo il loro impianto.



Fig 4-2 Rilevazione e misurazione di una giovane pianta di *A. nebrodensis* della rigenerazione naturale.

Misure gestionali.

I rilievi sulla rinnovazione naturale hanno permesso di individuare e registrare un totale di 484 piantine di *A. nebrodensis*, suddivise tra 15 piante madri.

La conoscenza dell'esatta ubicazione della rinnovazione naturale e la mappatura effettuata sono state di riferimento per la collocazione delle nuove recinzioni intese a massimizzare la protezione nei confronti di daini e cinghiali delle piante madri e delle giovani piantine in fase di accrescimento e affermazione.

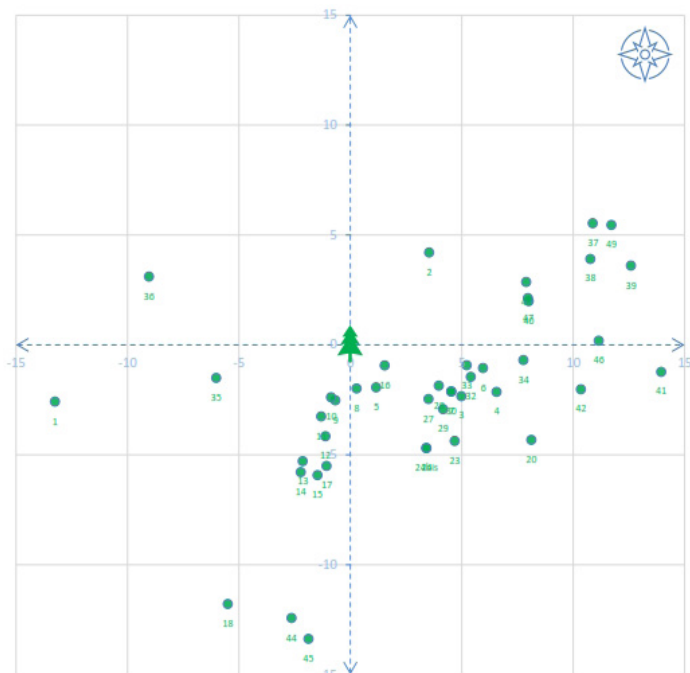


Fig 4-3 Mappa della rigenerazione naturale dell'albero di *A. nebrodensis* n. 18 (posizionato al centro del lotto).

4.4 Installazione di un nuovo sistema di recinzioni.

Per favorire la sopravvivenza e l'affermazione della rinnovazione naturale, le recinzioni allestite intorno agli alberi adulti *A. nebrodensis* sono indispensabili per ridurre le interferenze esterne (tra cui gli erbivori selvatici) nei processi di germinazione dei semi e sviluppo delle piantine.

Il progetto LIFE4FIR ha pianificato l'estensione e il rafforzamento del sistema di recinzioni intorno agli alberi *A. nebrodensis* per soddisfare tre esigenze fondamentali: 1) sostituire le recinzioni esistenti ormai deteriorate e non più funzionali; 2) sostenere e proteggere la rinnovazione naturale affermatasi esternamente alle vecchie recinzioni; 3) rafforzare le misure di protezione degli alberi adulti con recinzioni più estese e più alte. Il nuovo sistema di recinzioni è stato progettato e installato su una superficie più ampia, aumentando la superficie di area protetta intorno agli alberi di *A. nebrodensis* fino a oltre 14000 m²

complessivi. Questa misura permetterà di assicurare il mantenimento di condizioni vegetative ottimali, preserverà la biocenosi attorno a ciascuna pianta e favorirà di conseguenza la rigenerazione naturale.

Messa in opera.

Le nuove recinzioni sono costituite da pali di castagno scortecciati del diametro non inferiore a cm 7 in testa e di altezza non inferiore a m 2,40, posti in opera, previo calafataggio della parte appuntita per cm 60 con catrame a freddo, alla distanza media di m 2 ed interrati per cm 40. Sono realizzate con rete metallica in filo di ferro zincato a maglia degradante dell'altezza di m 1,60, del peso minimo di Kg. 0.70 al metro lineare, fissata (a mezzo filo zincato) su quattro ordini di filo di ferro zincato del diametro di mm 2,70 ancorati ai paletti a mezzo di cambrette e posti rispettivamente al livello del suolo, ad 1,40 m, a 1,60 m ed a 1,90. Ogni recinzione è dotata di ingresso a mezzo cancello di 1,5 m di larghezza costruito secondo lo schema previsto dal progetto utilizzando pali di castagno.

Poiché le piante di *A. nebrodensis* si trovano in luoghi molto impervi dove la meccanizzazione di qualsiasi attività è praticamente impossibile, inizialmente è stato necessario procedere al ripristino e all'apertura di piccoli sentieri per il raggiungimento delle piante. Soltanto in un secondo momento è stato possibile trasportare il materiale necessario per la realizzazione delle recinzioni.



Fig.4-4 Nuove recinzioni installate intorno all'albero di *A. nebrodensis* n. 12 come protezione contro gli erbivori selvatici.

4.5 Videosorveglianza.

Un sistema di videosorveglianza è stato installato come forma di dissuasione e per il controllo della fauna selvatica e del bestiame abbandonato.

Il sistema è stato installato posizionando le postazioni in 5 aree di maggior accesso del popolamento di *A. nebrodensis*. Per l'installazione sono stati utilizzati pali di castagno di 5m di lunghezza, aventi una sezione di 18-22 cm alla base e di 12-16 cm alla cima. I pali sono stati saldamente interrati per 1m, evitando l'uso di plinti in cemento. Alla sommità dei pali è stato installato il kit costituito da telecamera tropicalizzata (resistente all'acqua e alla polvere) con risoluzione di 2MP e sensore di movimento e dal pannello fotovoltaico di 40 W, dotato di una batteria di 20 Ah. Attraverso un router LTE/4G le immagini acquisite possono essere trasmesse ai cellulari attraverso SIM card. Le immagini potranno essere salvate anche in memorie locali di tipo SD. Il sistema è stato poi potenziato per permettere la trasmissione delle immagini acquisite in tempo reale attraverso satellite. completare



Fig 4-5 Una delle cinque stazioni del sistema di videosorveglianza.

5. MISURE DI CONSERVAZIONE EX SITU

Il progetto LIFE4FIR ha intrapreso misure per assicurare la conservazione ex situ del germoplasma di *Abies nebrodensis*, attraverso la realizzazione di un arboreto clonale e la messa in funzione di una banca del seme e di una criobanca. Queste iniziative svolgono un ruolo fondamentale nella conservazione e gestione del patrimonio genetico di *A. nebrodensis*.

5.1 Arboreto clonale.

L'arboreto clonale è concepito non solo come semplice raccolta di germoplasma, ma anche come impianto per la produzione futura di seme caratterizzato da una maggiore variabilità genetica, poichè viene favorito l'esoincrocio.

L'arboreto clonale consentirà inoltre un monitoraggio costante dei singoli genotipi per quanto concerne accrescimento, habitus, fenologia ecc., a fini scientifici e didattici. In futuro, quando le piante raggiungeranno la maturità, l'arboreto sarà utilizzato come nuova fonte da cui prelevare seme, o altro materiale di propagazione, evitando gli impatti negativi sulla popolazione naturale.

Per la realizzazione dell'arboreto clonale, ogni singolo genotipo della popolazione naturale di *A. nebrodensis* è stato propagato vegetativamente con la tecnica dell'innesto. La disposizione dei cloni nell'impianto è stata finalizzata a favorire la fecondazione incrociata.

Propagazione per innesto.

La propagazione per talea e la micropropagazione sono in genere le tecniche più efficienti di riproduzione vegetativa. Molte specie di conifere, invece, non rispondono a queste tecniche, producendo risultati limitati, non sufficienti a garantire un numero di piante adatte all'impiego nella riforestazione. In tutti questi casi, incluso *Abies nebrodensis*, è necessario ricorrere alla propagazione per innesto. La tecnica utilizzata in questo progetto è denominata "innesto per approssimazione laterale", in assoluto la più utilizzata nei vivai per la propagazione ad innesto di varie specie di conifere.

Un protocollo sviluppato per *A. nebrodensis*.

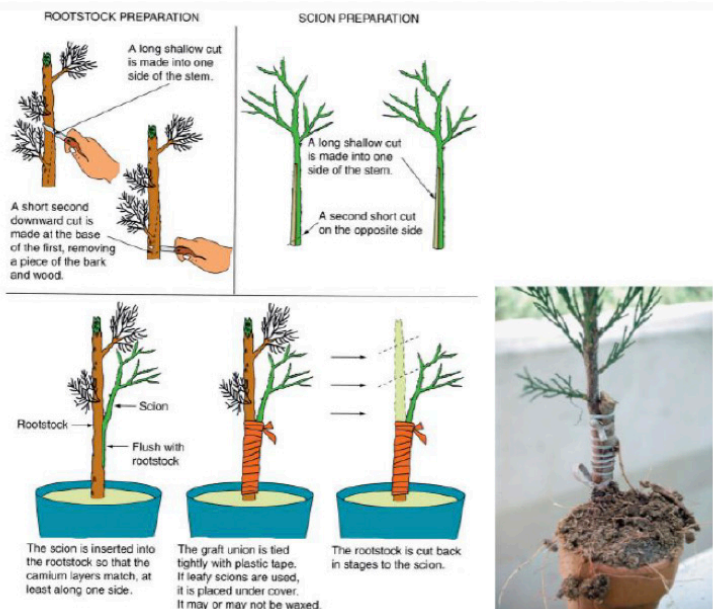
La procedura specifica di seguita per la propagazione per innesto dell'*Abies nebrodensis* è qui riassunta.

- Due settimane prima dell'innesto, i portinnesti (piantine di *A. nebrodensis*) sono stati trasferiti in serra per forzare l'attività vegetativa e la crescita delle radici. I substrati sono stati inumiditi, evitando che fossero troppo bagnati. I 7-10 cm inferiori dei fusti delle piantine sono stati mantenuti puliti eliminando eventuali rami, aghi e terriccio presenti.
- Le marze sono state raccolte all'inizio di aprile, compatibilmente con le condizioni climatiche e l'eventuale presenza di neve. Tuttavia, al momento della raccolta le piante presentavano ancora le gemme chiuse.
- Le marze sono state conservate a 4° in una cella refrigerata ed entro tre giorni dopo la loro raccolta è stato effettuato l'innesto. Portinnesti, marze e attrezzature sono state assemblate in una comoda postazione di lavoro nel vivaio. È stata organizzata una squadra di 6 persone (innestatori esperti, più aiutanti); i coltelli da innesto sono stati preparati estremamente affilati e puliti.
- Le marze prelevate erano getti terminali lunghi 10-15 cm, prelevati principalmente nel terzo inferiore dell'albero, e sono state preparate eliminando eventuali aghi nella metà inferiore della lunghezza.
- Il primo taglio è stato effettuato su una sezione diritta, priva di imperfezioni e ferite nei 4 pollici inferiori del fusto del portinnesto. Tutti i tagli sulla marza e sul portinnesto sono stati eseguiti con un unico movimento fluido. Ciò ha prodotto la superficie migliore per l'accoppiamento della marza con il portinnesto. Il primo taglio è stato effettuato verso il basso per creare un piccolo lembo sul fusto del portinnesto. La larghezza di questo taglio era il più vicino possibile alla larghezza delle marze, pur penetrando nella corteccia del portinnesto.
- È stato effettuato un taglio verso il basso ad un angolo all'estremità della marza per creare un lembo. La lunghezza del taglio era pari alla lunghezza del taglio effettuato sul portinnesto.
- La marza è stata poi inserita nella "tasca", ricavata nella parte

basale tagliata del portinnesto, e il lembo tagliato della marza allineato con la superficie tagliata del portinnesto. Con l'innesto correttamente eseguito, la marza è rimasta perfettamente inserita nella tasca del portinnesto, grazie al perfetto allineamento delle superfici tagliate.

- Le marze sono state legate con una fascetta di gomma per serrare l'innesto; l'area avvolta della striscia inizia e termina sopra e sotto i tagli. La zona innestata è stata poi ricoperta con un foglio di alluminio per limitare la disidratazione.

- Poiché le conifere necessitano di elevata umidità durante l'attecchimento della marza, le piante innestate sono state coperte con un sacchetto di plastica trasparente.



"Veneer-side graft", una tipica tecnica di innesto utilizzata nelle conifere

Le piante innestate sono state riportate in serra, dopo aver tagliato la parte superiore del portinnesto. Il terriccio nei vasi è stato periodicamente inumidito, evitando lo sgocciolamento. Particolare attenzione è stata riservata ad evitare la disidratazione del terreno, essendo questo un momento critico per il successo degli innesti. Le

piante necessitano di luce, ma occorre evitare la radiazione solare diretta e intensa. Dopo circa 4-5 settimane, è stato rimosso il sacchetto in plastica ed è stato tagliato un altro terzo del portinnesto, appena sopra l'inserimento della marza. Tra la metà e la fine dell'estate, la fascetta elastica è stata rimossa per evitare che potesse comprimere eccessivamente il fusto nel punto di unione. Le piante innestate sono state poi spostate all'esterno, in una zona ombreggiata del vivaio. Al rilievo effettuato a 4 mesi dall'innesto, oltre il 50% degli innesti risultava attecchito, un risultato di assoluta eccellenza per una specie come *A. nebrodensis*. Le piante innestate andranno sostenute con picchetti per i primi due anni per favorire un tronco dritto. La disposizione dei genotipi nell'arboreto clonale è stata dettata dalla necessità di favorire la fecondazione incrociata, tenendo conto anche dei dati sulle distanze genetiche tra gli ortet.



Fig 5 Propagazione per innesto

5.2 Banca del seme.

Le banche del seme rappresentano il sistema di conservazione ex situ più utilizzato per la conservazione della biodiversità vegetale. Il tempo massimo di conservazione è variabile in funzione della specie, e può raggiungere spesso molte decine di anni, durante i quali periodicamente vengono ripetuti i test di germinazione e vitalità dei semi.

I campioni di seme raccolti dalle 30 piante adulte di *Abies nebrodensis* sono conservati nella Banca del Seme, recentemente istituita presso il Museo dell'*Abies nebrodensis* del Comune di Polizzi Generosa grazie al progetto LIFE4FIR.

Raccolta dei semi.

I coni maturi sono stati raccolti dagli alberi di *Abies* in ottobre e poi essiccati fino all'equilibrio in ambiente controllato. I semi maturi sono stati puliti da eventuali impurità rimanenti e il loro contenuto di umidità è stato misurato su un campione di 3 semi. Il contenuto medio di umidità del 6,3% e poi i semi sono stati conservati a +4°C fino all'inizio degli esperimenti.

Selezione dei semi.

La massiccia presenza di semi vuoti, privi di embrione, rappresenta un problema ai fini della conservazione. Pertanto, in questo progetto è stata applicata una procedura basata su una scansione con raggi X dei singoli lotti di seme per selezionare i semi pieni..

L'immagine ai raggi X permette di discriminare i semi vuoti o attaccati da insetti o da malattie.

I semi, posti in laboratorio in piastre quadrate di plastica da 100 pozzetti (20x20 cm), sono stati scansionati e fotografati con il dispositivo Gilardoni radio light, Lecco, Italy. La procedura ottimale è stata messa a punto utilizzando una pellicola per raggi X, esposta a 25 kV, 3 mA (soft X-rays) a una distanza di 45 cm dalla fonte di raggi X per 2 min.

Le immagini a raggi X sono state verificate per la presenza di endosperma ed embrione. Il seme è stato considerato anormale se una o entrambe le strutture (cavità embrionale ed endosperma) erano deformate. Per avere una validazione di questa tecnica, un campione

di semi, dopo esame radiografico, è stato aperto e controllato allo stereoscopio per confermare la presenza dell'embrione.

Test di vitalità dei semi con tetrazolio (TTC).

Semi maturi sono stati mantenuti a 4°C per 6 mesi. Saggi in vitro sono stati applicati sui semi e embrioni zigotici per valutarne la vitalità e la germinazione prima di iniziare la conservazione.

La vitalità dei semi è stata valutata con il test del tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro, TTC). Il test TTC si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio solubile e incolore a precipitato insolubile di colore rosso in presenza di attività deidrogenasi nelle cellule vive. Il colore rosso dell'embrione zigotico era il principale indicatore di vitalità del seme.

Germinazione in vitro.

Dopo la sterilizzazione superficiale con etanolo al 70% e ipoclorito di sodio, i semi sono stati immersi in acqua per 48 ore in condizioni di sterilità prima dell'estrazione degli embrioni zigotici.

Il test di germinazione è stato effettuato utilizzando il substrato MS (Murashige e Skoog

1962) senza l'aggiunta di ormoni. Ogni due settimane dall'inizio della coltura in vitro, il tasso di germinazione è stato calcolato come percentuale del numero di embrioni germinati rispetto al numero di embrioni coltivati. Il tasso di germinazione degli embrioni campionati è risultato del 66-100%.

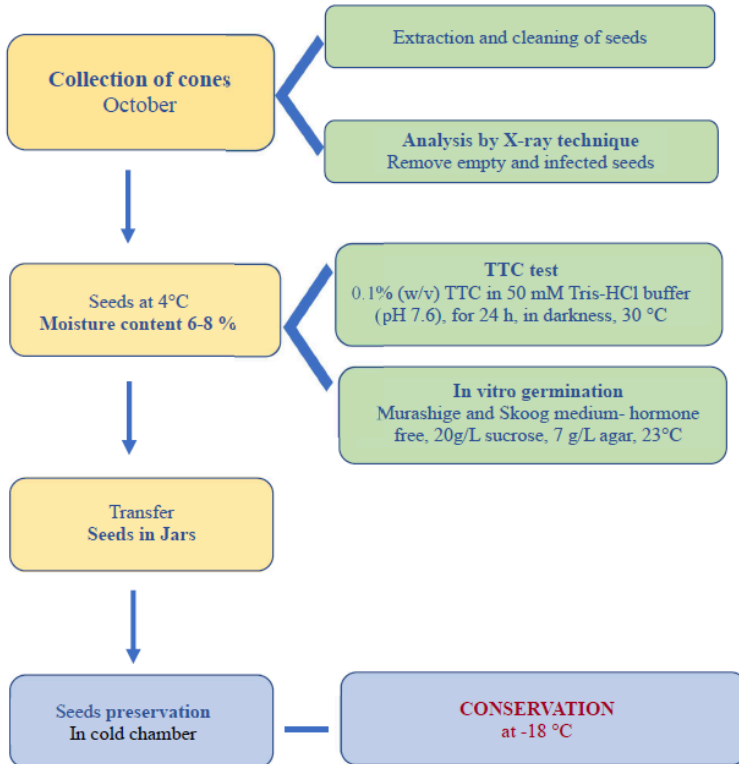
Conservazione dei semi a bassa temperatura (-18°C).

Seguendo lo standard internazionale per la conservazione delle sementi a lungo termine (FAO/IPGRI 1994), è stata prevista la conservazione a una temperatura pari o inferiore a -18°C, con contenuto di umidità dei semi (MC) del 3-7%. Un campione di semi è stato utilizzato per saggiare l'efficacia di questa procedura di conservazione. Dopo 6, 9, 12 mesi di conservazione a -18°C, i test di germinazione e vitalità con TTC hanno mostrato buoni risultati per ciascun periodo valutato.

Per conservazione i semi sono stati posti in vasetti DAGKLAR 0,4 l

di vetro trasparente/acciaio inossidabile, riportando in etichetta le informazioni connesse: ubicazione banca dei semi, specie, numero Id della pianta, anno di raccolta, quantità (gr), numero di semi, data inizio conservazione.

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



5.3 Conservazione del germoplasma in criobanca.

La crioconservazione, ovvero lo stoccaggio a temperature ultra-basse come quella dell'azoto liquido (-196°C), è la tecnica più innovativa per la conservazione a lungo termine delle risorse genetiche vegetali. La tecnica preserva organi e tessuti ottenuti dalla coltura in vitro e dal campo, mediante un processo di ultra-congelamento che ostacola quasi tutti i processi metabolici nella cellula, preservandone la sua struttura e la funzionalità biologica.

Dispositivo per la conservazione dei campioni a -196°C.

Per una conservazione illimitata a -196°C, del materiale biologico di *Abies nebrodensis* (semi, embrioni escissi, polline, callo embriogenico) la scelta del dewar ha tenuto conto dell'affidabilità, sicurezza, garanzia di funzionamento e basso consumo di azoto liquido. Si tratta del Locator 8 Plus, commercializzato dalla VWR International Srl di Milano, Italia. Le caratteristiche salienti della camera climatica Locator 8 Plus sono le seguenti:

- contenitore per la conservazione dei campioni (dewar) dotato di monitor di livello ad ultrasuoni.
- capacità 121 litri
- 8 rack per unità, con una capacità di 10 scatole per rack e 25 criovials da 2 ml per scatola
- capacità totale: 2000 criovials
- tasso di evaporazione statica: 0,6 L/giorno
- diametro del collo: cm 15,2
- dimensioni esterne diametro x altezza: cm 55,8 x 95,3
- dotato di coperchio con serratura.



Fig 5-1 Preparazione delle criobox contenenti il germoplasma di *A. nebrodensis* (pollini, embrioni, linee embrioniche) per la conservazione nella criobanca.

Conservazione degli embrioni a temperatura criogenica (-196°C).

Per la crioconservazione sono stati utilizzati embrioni zigotici estratti dai semi maturi sterilizzati, con un contenuto di umidità (MC) dell'8,9% determinata con analizzatore di umidità.

Per effettuare l'esperimento, gli embrioni zigotici sono stati divisi in due gruppi, uno trattato con soluzione di vetrificazione vegetale (+PVS2) e uno non trattato (-PVS2). Successivamente le criobox sono state estratte dall'azoto liquido e scongelata a bagnomaria (40 °C) per 1 minuto.

Una germinazione degli embrioni zigotici del 90-95% è risultata sia per gli embrioni trattati con la soluzione PVS2 e che per quelli non trattati. Tutti gli embrioni colorati con TTC sono risultati colorati completamente di rosso dopo il recupero da LN. Quindi, i risultati evidenziano il potenziale della tecnologia criogenica per la conservazione degli embrioni zigoti di *A. nebrodensis*.

Conservazione del polline a temperatura criogenica.

La conservazione del polline è uno strumento importante per il mantenimento delle risorse genetiche vegetali e può promuovere una maggiore efficienza nei programmi di allevamento e di conservazione e scambio di germoplasma.

La conservazione del polline va intesa come un mezzo aggiuntivo per la conservazione del germoplasma vegetale e non un sostituto della conservazione di semi o di materiali clonali.

Il successo della conservazione del polline dipende da fattori ambientali quali umidità e temperatura di conservazione.

La vitalità del polline e la germinabilità variano nel tempo nelle diverse specie e devono essere valutate prima e dopo la crioconservazione.

Un contenuto di umidità del polline compreso tra l'8 e il 10% evita la formazione di cristalli di ghiaccio durante il processo di congelamento.

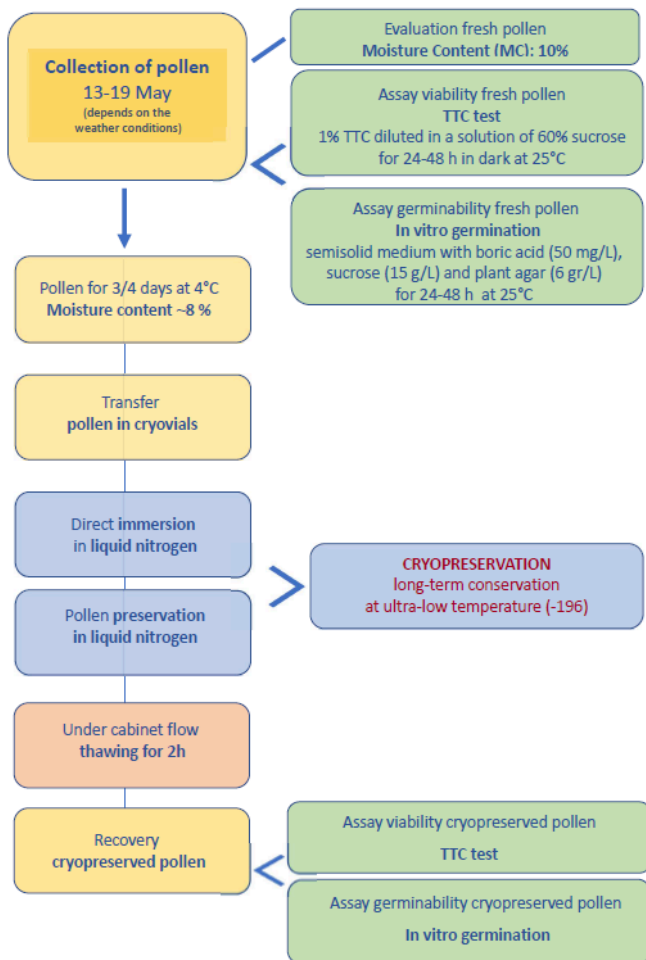
Raccolta, morfologia e contenuto di umidità del polline di *A. nebrodensis*.

Le condizioni di campo e l'umidità relativa al momento della raccolta influenzano il contenuto di umidità del polline. Il polline è stato raccolto in due volte da varie piante nel maggio 2020.

Dopo la rimozione dalle antere, il polline raccolto è stato setacciato (Fig. 1A e 1B) e si è proceduto alla caratterizzazione della morfologia, contenuto di umidità, vitalità e la germinabilità.

Il contenuto di umidità (MC) è stato determinato con il Moisture Analyser, su un campione di 0,2 gr di polline. Nel polline fresco il MC era in media del 10%. Il polline di *A. nebrodensis* è stato quindi osservato mediante stereomicroscopio (Fig. 2 A), microscopio ottico e ESEM.

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



Saggi di vitalità e germinabilità del polline.

Prima e dopo la crioconservazione del polline sono stati effettuati test TTC. Due gocce di questa miscela sono state poste su un vetrino da microscopio, il polline di *A. nebrodensis* è stato quindi spolverato sopra, coperto con un copri-oggetto e tenuto in incubazione al buio per 24-48 ore a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, ciascun campione è

stato osservato al microscopio e i granuli di polline colorati di arancione o rosso brillante sono stati considerati vitali.

Test di germinazione in vitro.

Il polline germina in vitro ponendo i granuli di polline su un mezzo semisolido e misurando l'allungamento del tubo pollinico dopo poche ore. Tubetti pollinici che avevano raggiunto una lunghezza pari a due volte il diametro del granello di polline sono stati considerati come germinati (Fig. 4).

Il terreno utilizzato per il polline di *A. nebrodensis* era costituito da acido borico (50 mg/L), saccarosio (15 g/L) e agar (6 g/L). Il polline è stato mantenuto a 25°C, la temperatura ottimale per il test di germinazione.

Conservazione in azoto liquido e valutazione della vitalità e germinabilità.

Dopo l'estrazione dai coni, il polline è stato mantenuto per tre giorni a 4°C, al fine di ridurre la MC fino all'8%. I campioni di polline sono stati quindi trasferiti nelle criovials e posti in criocconservazione. Dopo la conservazione in azoto liquido, le criovials sono state scongelate mantenendole sotto una cappa a flusso laminare per 2 ore a temperatura ambiente e poi trasferite in piastre Petri.

Mediante l'applicazione delle procedure sopradescritte, la percentuale di granuli di polline vitali osservati variava tra l'88% e il 96%, senza deviazioni significative dal polline fresco. Lo stesso risultato è stato osservato nel test di germinazione, con una percentuale di granuli germinati variabile dall'84% al 94%.

Conservazione di calli embrionici a temperatura criogenica.

L'embrionesi somatica, riconosciuta come uno strumento avanzato in silvicoltura, viene applicata da oltre tre decenni, ed è stata inizialmente sviluppata per le specie di conifere. L'applicazione pionieristica con l'abete rosso ha dimostrato il suo potenziale, evolvendosi in un metodo vantaggioso per specie ecologicamente ed economicamente significative.

L'embrionesi somatica è stata applicata per la propagazione di varie

varie specie del genere *Abies*.

La combinazione di questo approccio con la crioconservazione consente la propagazione e la conservazione su larga scala delle risorse forestali. È stato ottenuto un successo sostanziale nella produzione di embrioni somatici di specie commercialmente importanti. Tuttavia, per l'*Abies nebrodensis*, l'ottenimento del callo embriogenico si è rivelato difficoltoso.

Protocollo di embriogenesi somatica per *A. nebrodensis*

Coni non maturi, contenenti semi in fase di embriogenesi avanzata, sono stati raccolti in due date diverse, metà e fine luglio 2020, mentre i coni maturi sono stati raccolti durante l'ultima settimana di settembre 2020.

Inizialmente è stata effettuata la selezione di semi mediante la procedura a raggi X, osservando la presenza e la morfologia degli embrioni.

Sterilizzazione dei semi ed estrazione degli embrioni.

I semi sono stati lavati con detergente per circa 30 minuti, quindi sciacquati con acqua corrente per 4 ore.

I semi immaturi sono stati quindi immersi in etanolo al 70% per 1 minuto, mentre i semi maturi per 5 min. I semi sono stati poi risciacquati cinque volte con acqua distillata sterile.

I semi sono stati successivamente immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio al 20% (v/v) a cui sono state aggiunte alcune gocce di Tween 20 per 20 minuti e risciacquati 3 volte con acqua sterile.

Sotto cappa a flusso laminare, il tegumento è stato rimosso dai semi immaturi e il megagametofito è stato utilizzato come espianto.

I semi maturi sono stati immersi in acqua sterile per 48 ore quindi gli embrioni zigotici sono stati accuratamente estratti utilizzando una pinza sterile.

Induzione e proliferazione del callo da embrioni maturi.

Gli embrioni maturi sono stati asportati e coltivati orizzontalmente su diversi terreni di coltura per l'induzione del callo.

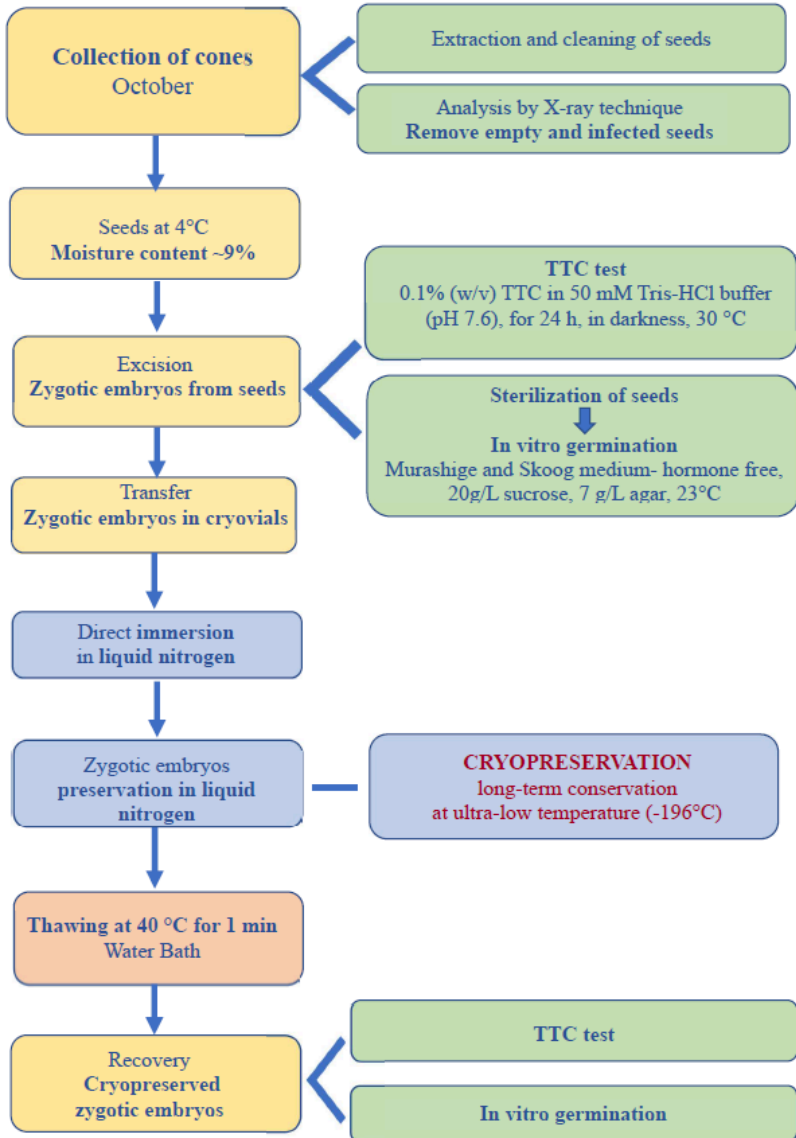
Gli embrioni sono stati escissi da semi maturi raccolti in ottobre e

collocati orizzontalmente in piastre Petri. Il callo embriogenico è stato ottenuto, per la prima volta in questa specie, utilizzando substrato SH (Schenk e Hildebrandt, 1972) con citochinina (BAP, 1 mg/L). Dopo 2 settimane su un substrato di induzione al buio, il callo sviluppato è stato separato dall'embrione e trasferito in un substrato fresco per la proliferazione, trattando ogni callo come singola linea cellulare. Come substrato di proliferazione è stato utilizzato SH, addizionato di ABA 4,27 μ M, PEG-4000, 8 % and 4 % of maltosio. Il tessuto embriogenico (ET) è stato mantenuto al buio a 25 °C e sottoposto a subcoltura su substrato fresco ogni 15 giorni. Dopo l'ottenimento di una quantità sufficiente di ET, le singole linee cellulari sono state trasferite su un substrato di maturazione (SH con acido abscissico 10 mg/L, polietilenglicole 8%, e maltosio 40%). Le colture sono state mantenute a 25° C, al buio, effettuando le subcolture ogni 2 settimane. La formazione di ET è stata continuamente osservata allo stereomicroscopio, insieme allo sviluppo degli embrioni somatici.

Incapsulamento e crioconservazione dei calli embriogenici.

Piccoli frammenti (0,5 g) di callo embriogenico derivati due alberi, IN8 e IN10, sono stati incapsulati in sfere di alginato secondo il protocollo Micheli e Standardi (2016). Successivamente, sono stati lavati con acqua distillata sterilizzata e quindi immersi in una soluzione di alginato di sodio al 3% (p/v). Gocce di matrice incapsulante contenente ET sono state quindi trasferite per 20 minuti nel mezzo basale MS addizionato con 11,1 mg di L-1 cloruro di calcio per ottenere delle capsule di ET (Figura 7). Dopo il lavaggio in acqua sterile, per la crioconservazione, le sfere sono state trattate con la soluzione di caricamento trasferita in una soluzione liquida contenente terreno MS addizionato con il 34,2% di saccarosio. Successivamente, le capsule con ET sono state trattate con Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) a 0 °C. Tutte le capsule con ET sono state quindi immerse in azoto liquido. Dopo lo scongelamento a bagnomaria (2 minuti a 40 °C), le capsule con ET sono state trasferite su terreno SH arricchito con 4,43 μ M di BAP (lo stesso mezzo utilizzato per la proliferazione) per testare la vitalità.

5. Final Protocol for *A. nebrodensis* zygotic embryos conservation in cryobank (-196°C)



6. RIPOPOLAMENTO IN NUCLEI DI RE-DIFFUSIONE CON PIANTINE SELEZIONATE

Uno degli obiettivi principali del progetto è quello di realizzare dei nuovi nuclei di ripopolamento utilizzando piantine selezionate di *Abies nebrodensis* ottenute da impollinazioni incrociate.

La scelta dei siti in cui effettuare le nuove piantagioni ha fatto riferimento anche ai risultati ottenuti negli impianti realizzati in precedenti progetti. Partendo dall'analisi dei dati raccolti, sono stati effettuati sopralluoghi nel territorio del Parco delle Madonie per individuare i siti caratterizzati da adeguate caratteristiche ecologico-ambientali e che abbiano dato buoni risultati.

I dieci siti selezionati ricadono prevalentemente in aree comprese tra 1100 e 1600 m s.l.m. di altitudine, distribuiti nei comuni di Polizzi Generosa, Isnello, Petralia Soprana, Petralia Sottana, Geraci Siculo e Gratteri. Tutti i siti ricadono all'interno di aree gestite dall'Assessorato allo Sviluppo Agricolo e Territoriale della Regione.

Due siti si trovano ad una quota inferiore, tra i 750 e gli 850 m s.l.m. sono giustificati dalla considerazione che *A. nebrodensis* in passato cresceva a quote inferiori rispetto all'attuale popolazione residua, ristretta in aree poco accessibili tra 1400 e 1600 m s.l.m. di altitudine.

I siti situati tra i 1100 ed i 1400 m s.l.m. di quota fanno parte dell'associazione climax *Ilici aquifolii-Quercetum austrotyrrhenicae*, un'associazione forestale relitta di notevole interesse geobotanico insediata sulle areniti quarzose.

I siti situati sopra i 1400 m s.l.m. ricadono nella fascia altimetrica dei boschi di faggio, legati all'associazione climax *Geranium versicoloris-Fagion*.

Alcuni siti (Quacella, Piano Formaggio, Favarotti), pur essendo situati su un substrato calcareo, presentano un terreno profondo e decalcificato. Potenzialmente sono caratterizzati da tratti vegetazionali riconducibili alla lecceta mesofila (*Quercetum ilicis*), associazione caratterizzata dalla presenza di *Ilex aquifolium* e di alcune specie arboree decidue. I due siti selezionati alle altitudini inferiori (750-850 m s.l.m.)

La maggior parte degli siti ha un'esposizione N-NO e presenta una

copertura totale o parziale da parte di formazioni boscate di conifere come *Pinus nigra*, *Cedrus atlantica*, con partecipazione di latifoglie come *Q. petraea*, *F. sylvatica*, *Q. ilex*, *Fraxinus ornus*, *Ilex aequifolium*, *Acer campestre*, oppure di *Q. ilex*. La presenza di uno strato coprente è essenziale nell'accrescimento giovanile di *A. nebrodensis*, per evitare l'insolazione diretta.

La piantumazione è stata effettuata seguendo le curve di livello e l'esposizione del sito. Per consentire alle giovani piante di crescere correttamente è stato mantenuto un distanziamento adeguato, pur evitando un sesto d'impianto geometrico. Ove necessario, occorre rimuovere lo strato erbaceo, avendo cura di non danneggiare eventuali specie rare e/o endemiche presenti.

In base agli obiettivi del progetto LIFE4FIR, i singoli appezzamenti avranno una superficie compresa tra 3000 e 4000 m² e il numero di piante che verranno messe a dimora sarà di 400 ciascuno.

Per la realizzazione dei singoli appezzamenti gli interventi sono stati realizzati nelle seguenti fasi: installazione delle recinzioni, apertura delle buche, piantumazione di specie leguminose valorizzanti, messa a dimora di piantine di *A. nebrodensis*.

Recinzioni.

Le recinzioni sono state installate lungo il perimetro di ogni area, seguendo la stessa procedura utilizzata per le recinzioni predisposte a protezione degli alberi del popolamento naturale. Sono stati utilizzati pali di castagno del diametro di 8-10 cm e della lunghezza di 2,40 m, inseriti nel terreno per circa 40 cm e posti ad una distanza di 2 m l'uno dall'altro (Fig. 2).

L'altezza fuori terra delle recinzioni è di circa 2 m. Quattro ordini di filo zincato ancorati ai pali sono stati fissati ad una rete metallica progressiva di altezza pari a 1,65 m ad un filo sovrastante. L'accesso alle parcelle sarà consentito da cancelli larghi 1,5 m e alti 1,80 m (Fig. 3). Una volta installati, i cancelli verranno mantenuti tramite ghette in ferro ancorate ai pali di castagno.

Scavo delle buche.

L'apertura delle buche nel terreno è stata effettuata sia con mezzi meccanici che con attrezzature agricole specifiche. Le buche non hanno uno schema di spaziatura ben definito ma sono state posizionate in base alle caratteristiche del sito. Generalmente sono distanziate di circa 3-4 metri l'una dall'altra. Per garantire alle giovani piantine di *A. nebrodensis* uno sviluppo armonico dell'apparato radicale ed una maggiore riserva idrica, sono stati praticati scavi di forma tronco-conica e tronco-piramidale. Le buche avevano una larghezza di circa 80 cm nella parte inferiore e di circa 50 cm nella parte superiore.



Fig 6-1 Una recinzione di recente installazione intorno a uno dei lotti allestiti per la ripopolazione di *A. nebrodensis*.

Messa a dimora di leguminose protettive.

La concomitante piantumazione di arbusti appartenenti alla famiglia delle Fabaceae è finalizzata a migliorare la fertilità del terreno e ad assicurare un'adeguata protezione alle piantine di *A. nebrodensis* sia dall'eccessiva radiazione solare, sia dal caldo che dalla siccità estiva dopo il trapianto. Gli arbusti a crescita rapida contribuiranno a mantenere condizioni microclimatiche adatte allo sviluppo delle piantine di *A. nebrodensis* nel periodo primaverile-estivo e a proteggerle dai forti venti. Gli arbusti utilizzati, di 2-3 anni di età, appartengono ai generi *Genista*, *Spartium* e *Cytisus*, e sono stati piantati a una distanza di circa 50 cm dalle piantine di *A. nebrodensis*. Generalmente sono stati inseriti due arbusti per ogni singola piantina di *A. nebrodensis*.



Fig 6-2 Una giovane pianta di *A. nebrodensis* viene trapiantata.

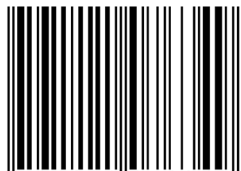
Messa a dimora di piantine di *Abies nebrodensis*.

Per ogni singolo appezzamento sono state messe a dimora 400 piantine coltivate in contenitori 9x9x20 cm in vivaio. Le piantine utilizzate circa 3 anni. In vivaio sono state trapiantate dopo 1 anno e sottoposte a micorrizzazione. La piantumazione, come sopra accennato, non è stata effettuata sempre secondo uno schema geometrico ma in molti casi è stata basata sulla morfologia del terreno e sulla vegetazione già insediata. Negli impianti realizzati sotto copertura arborea, le piantine di *A. nebrodensis* sono state piantate a nord del tronco. Nelle aree rimboschite con spaziatura geometrica degli alberi, le piantine di *A. nebrodensis* sono state posizionate secondo uno schema a quinconce. Del fertilizzante organico ricco di fosforo è stato aggiunto nella buca per aiutare le piantine messe a dimora. Dopo la piantumazione è stato creato un avvallamento nel terreno attorno ad ogni singola pianta per favorire l'accumulo dell'acqua. Inoltre, al fine di ridurre l'evaporazione dal terreno attorno alla buca, in primavera è stata effettuata una pacciamatura con materiale vegetale ottenuto dalle specie erbacee presenti nelle immediate vicinanze degli appezzamenti. Negli impianti sono state inoltre realizzate 50 buche di 40x40x40 cm per la semina diretta di *A. nebrodensis*, ponendo il seme ad una profondità di circa 3 cm, utilizzando cinque semi per buca.

Anno di pubblicazione **2024**



ISBN 979-12-210-7634-9



9 791221 076349