

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



**MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS PARA LA  
CONSERVACIÓN IN SITU Y EX SITU DE LAS ESPECIES  
DE ABIES MEDITERRÁNEAS AMENAZADAS**



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







## PRÓLOGO

Los ecosistemas naturales son una fuente multifuncional de bienes, recursos y servicios que benefician a la humanidad, tales como: alimentos, aire limpio, agua pura, energía y materias primas, beneficios sanitarios, recreativos y sociales. La biodiversidad de los ecosistemas sanos favorece la prestación productiva de sus múltiples servicios y les ayuda a responder a los impactos del cambio climático. Sin embargo, los ecosistemas naturales están cada vez más estresados debido al cambio climático, la pérdida y fragmentación de los hábitats, la contaminación y la introducción de especies exóticas como consecuencia de la excesiva presión antropogénica.

Los proyectos LIFE son herramientas para aplicar la política medioambiental de la UE. En particular, el subprograma LIFE Naturaleza y Biodiversidad financia desde 1992 proyectos de buenas prácticas, proyectos piloto y proyectos de demostración para la conservación de la biodiversidad, los hábitats y las especies. El proyecto LIFE4FIR (LIFE18 Nat / IT / 000164) "Estrategias decisivas de conservación in situ y ex situ para la conservación del abeto de la Madonie (*Abies nebrodensis*), en peligro crítico en Sicilia" ha sido financiado por este subprograma.

El abeto de la Madonie es el endemismo más representativo y conocido de Sicilia. Debido a su estado de peligro crítico, reconocido por la UICN, *Abies nebrodensis* desempeña un papel simbólico, ya que representa plenamente los efectos de la degradación del hábitat y la pérdida de biodiversidad causada por la sobreexplotación de los recursos naturales. En el caso del abeto de la Madonie, el declive comenzó en el siglo XIX, cuando esta especie todavía estaba muy extendida en las montañas del norte de Sicilia. La utilización masiva de árboles adultos como fuente de valiosa madera para la construcción, así como el pastoreo incontrolado han reducido drásticamente la población de esta especie relictiva, que hoy en día solo cuenta con 30 individuos.

A lo largo de las últimas décadas, se han dedicado una serie de proyectos a la salvaguarda de esta especie y a la conservación de la biodiversidad en el territorio del Parque de la Madonie. Entre ellos, un proyecto anterior LIFE2000NAT/IT/7228, seguido de un proyecto APQ (CIPE 2004). El proyecto LIFE4FIR ha aprovechado los resultados y conocimientos adquiridos por los proyectos anteriores para poner en marcha una estrategia exhaustiva, multidisciplinar e integrada, basada en el uso de técnicas innovadoras para responder a los principales factores de vulnerabilidad que afectan a *Abies nebrodensis* y mejorar su estado de conservación. El trabajo conjunto de las instituciones implicadas (Instituto para la Protección Vegetal sostenible e Instituto para la Bioeconomía del CNR; UNIPA-SAAF; La entidad Parco delle Madonie, el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla y el Departamento para el Desarrollo rural y territorial de la región de Sicilia) ha permitido avanzar en las cinco acciones clave del proyecto: 1. Mantener los árboles residuales de *Abies nebrodensis* en su hábitat natural (in situ). 2. Mantener la pureza de la población y aumentar la biodiversidad en las progenies. 3. Producción en viveros y selección de plántulas puras y vigorosas. 4. Intervenciones de replantación en zonas adecuadas del parque de Madonie con plántulas seleccionadas genéticamente para favorecer la propagación de la especie, y 5. Conservación ex situ con métodos biotecnológicos tradicionales e innovadores mediante la creación de un banco de semillas y un criobanco.

Este conjunto de acciones minuciosas y sinérgicas proporciona un modelo de procedimientos para la conservación a largo plazo de esta especie, que podría reproducirse eficazmente. Este manual informa de las directrices efectivas y sostenibles que están dando buenos resultados en la conservación de *Abies nebrodensis* y que pueden representar una referencia útil para aquellos comprometidos con la salvaguarda de la biodiversidad de los abetos (y coníferas) amenazados y en peligro de extinción en el área mediterránea.

# CAPITULO 1

## Evaluación de la diversidad genética y la estructura poblacional del relicto *Abies nebrodensis*

La biodiversidad es la base de la estabilidad, el funcionamiento y la productividad de los ecosistemas, así como de la prestación de sus servicios. También hay evidencias de que una diversidad genética alta beneficia el funcionamiento de los ecosistemas y la resiliencia, proporcionando la materia prima para que los individuos, las poblaciones y las especies evolucionen y se adapten, especialmente bajo nuevas condiciones ambientales (estrés abiótico, biótico, y cambio climático). Por ello, los individuos y las poblaciones que tienen una alta diversidad genética tendrán más posibilidades de persistencia y adaptación. Esto puede ser especialmente importante en el caso de la diversidad genética de los genes relacionados con la respuesta al clima. En resumen, la diversidad genética proporciona la base para la conservación de los recursos genéticos dentro de las especies y su mantenimiento es esencial para la supervivencia, adaptación y evolución de los individuos, las poblaciones y las especies para una gestión funcional del ecosistema.

Dado que los árboles son normalmente las especies clave de los ecosistemas forestales, su diversidad genética tiene una importancia especial y ha sido identificada como la base de la sostenibilidad forestal. El aprovechamiento forestal, las prácticas de renovación y las perturbaciones naturales pueden afectar a la demografía de la población y a varios procesos evolutivos, como la deriva genética, el flujo genético, la endogamia y la selección, al afectar a la densidad local de árboles. Esto lleva a la creación de cuellos de botella, fragmentación y estructura genética espacial, lo que puede afectar negativamente a la diversidad genética.

### **1.1 Evaluación de la diversidad genética de *Abies nebrodensis* en el marco del proyecto Life4fir**

Debido a la sobreexplotación en el pasado, el hábitat de *A. nebrodensis* se ha ido fragmentando cada vez más, y el tamaño de la población natural y el número de individuos han disminuido drásticamente, lo que ha provocado una importante pérdida de recursos genéticos. En la actualidad, la población es extremadamente pequeña, fragmentada y dispersa, lo que aumenta la probabilidad de endogamia y el potencial de deriva genética (Fig. 1, 2). Además, la producción irregular de semillas, el difícil reclutamiento de las plántulas y la falta de un mecanismo específico para la dispersión de semillas a larga distancia han dado lugar a una escasa regeneración de la población. La conservación de los recursos genéticos y los programas de mejora vegetal requieren una evaluación de la diversidad y la estructura genética de esta especie en peligro de extinción.

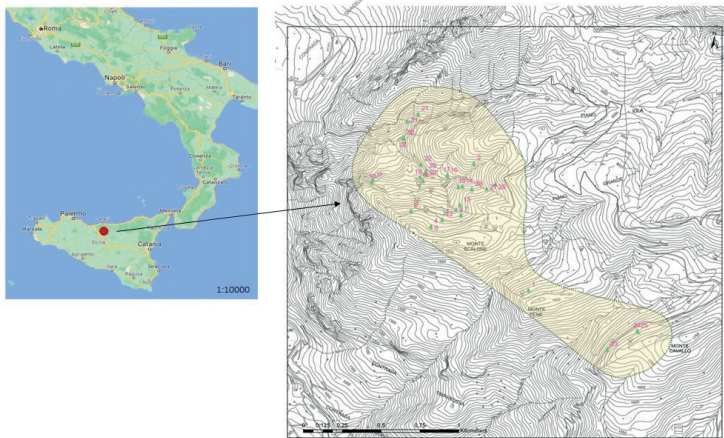


Figura 1. Localización del parque de Madonie en la región de Sicilia (izquierda) y mapa de la única población natural de *A. nebrodensis* (derecha). La posición de cada uno de los 30 árboles adultos se indica en un mapa regional de Sicilia a escala 1:10000.



Figura 2. Distribución dispersa de los árboles de *A. nebrodensis* en su hábitat natural.

Una de las acciones del proyecto Life4fir tiene como objetivo la evaluación de la diversidad genética de la población forestal amenazada de *A. nebrodensis* y las relaciones de parentesco entre los árboles adultos y la regeneración natural. Para ello se utilizaron marcadores genéticos SNPs para evaluar el genotipo de los árboles individuales, estudiar la diversidad genética y la estructura de la población natural. Además, se realizaron pruebas de paternidad en las plántulas para determinar la tasa de xenogamia (cruce entre individuos no emparentados), endogamia y autofecundación y para 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*).

## 1.2 Genotipado de SNPs

Para el genotipado de SNP se utilizó la tecnología OpenArrays basada en la PCR (ThermoFisher Inc., Estados Unidos). Esta tecnología proporciona una plataforma robusta y flexible que consigue una calidad de datos superior a la de otros marcadores moleculares y un alto rendimiento de las muestras con un bajo, lo que la hace ideal para estudios que implican grandes volúmenes de muestras.

La adopción de este enfoque es muy útil para el genotipado de poblaciones y la observación de mutaciones que se producen en todo el genoma. La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales recomienda los SNP y los microsatélites como marcadores preferidos para la toma de huellas de ADN y la caracterización varietal. Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es una variación del material genético en un solo nucleótido presente en la población en una proporción superior al 1%. Las diferencias de nucleótidos permiten distinguir entre variedades y ecotipos, e incluso entre individuos de una misma especie que estén emparentados estrechamente. Los datos producidos por la secuenciación, comparados con la información de las bases de datos públicas relativas a los genomas de las especies ya secuenciadas (referencia), conducen a la identificación de las diferencias de nucleótidos. Esto genera un perfil genético muy detallado, caracterizado por miles de SNPs, cada uno de los cuales está bien identificado por su posición en el genoma de la especie analizada (Fig. 3).

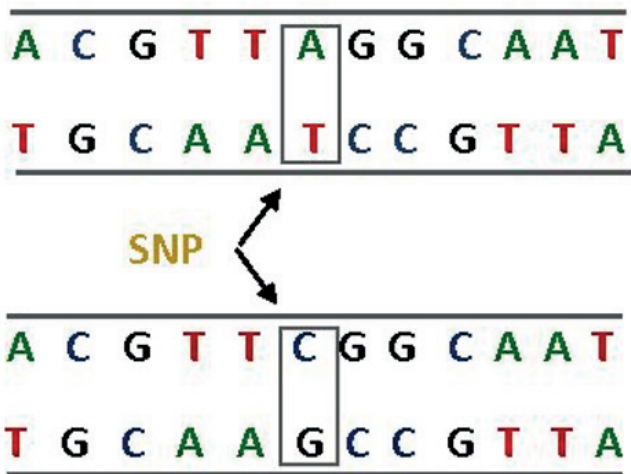


Figura 3. Representación esquemática del polimorfismo de un solo nucleótido

### 1.3 Prueba de paternidad

La prueba de paternidad se realiza para determinar el vínculo biológico entre la descendencia y un supuesto padre y generar una probabilidad de paternidad. A partir de los resultados de similitud genética obtenidos por el genotipado de SNPs, un software específico infiere el origen de cada individuo, asignando sus padres putativos, y determina la tasa de xenogamia, endogamia y una eventual hibridación con polen procedente de especies de *Abies* no autóctonas. La presencia de una alta tasa de endogamia o autofecundación suele ir acompañada de un agotamiento genético (homocigosis) que conduce a una población más susceptible a los estreses bióticos y abióticos. La prueba de paternidad permite además determinar el porcentaje de heterocigosis por lo que ofrece información sobre los mejores cruces para la mejora genética de una especie.

Resultados obtenidos con la población de *A. nebrodensis*

1. Los resultados precisos y fiables obtenidos con Open-array indican claramente que la mayoría de los árboles adultos de *A. nebrodensis* son genéticamente cercanos. El tamaño efectivo de la población, un parámetro clave en la genética de poblaciones para estimar el número de individuos que efectivamente aporta descendencia a la siguiente generación, es muy bajo. Estos hallazgos contrastan con los resultados de estudios anteriores basados en otros marcadores moleculares menos precisos, que mostraron altos índices de diversidad genética en la población natural de *A. nebrodensis*.
2. La prueba de paternidad mostró que más del 90% de las plántulas de la regeneración natural se originaron por autopolinización. Se esperaría que la deriva genética y la endogamia disminuyan la capacidad de estas plántulas para hacer frente a una amplia variedad de factores de estrés ambiental, lo que probablemente explicaría la baja tasa de supervivencia encontrada en estudios anteriores.
3. En el vivero, las plántulas de *A. nebrodensis* también mostraron altas tasas de endogamia (más del 95%) y se detectaron algunos híbridos procedentes de cruces con otros abetos.
4. Para las actividades de regeneración de la población, se ha diseñado un programa de polinización manual eligiendo los individuos genéticamente más distantes para mejorar la diversidad genética de la población y la supervivencia de las plántulas. Para ello se obtuvo una lista de los 30 cruces más recomendables entre árboles maduros de *A. nebrodensis*.



## **1.4 Conclusiones**

Los resultados sobre la uniformidad genética de la población y la alta tasa de autofecundación encontrada en la regeneración natural eran esperados y ya se había planificado el uso de cruces controlados entre plantas. Los resultados de los análisis genéticos realizados son de gran ayuda para la realización de los próximos cruces controlados, ya que se definieron las combinaciones entre plantas con mayor distancia genética. Los nuevos cruces se realizarán siguiendo estas combinaciones para aumentar al máximo la variabilidad genética de las progenies. Menos esperada fue la identificación de presuntos híbridos entre las progenies de polinización libre que se desarrollaban en el vivero local. Este hallazgo debe ser considerado con mucha precaución para la futura gestión de la población y tendrá un impacto en otras acciones del proyecto.

## CAPITULO 2

### Realización de cruces controlados para aumentar la variabilidad genética de la descendencia

El principal problema de la conservación de las especies amenazadas es que han sufrido una disminución gradual o repentina del número de individuos, lo que aumenta el riesgo de extinción. La estructura genética resultante de una población con cuello de botella puede tener también importantes consecuencias para su viabilidad a largo plazo y, por tanto, debe preocupar a los gestores de la conservación. Una de las consecuencias del pequeño tamaño de las poblaciones es que puede aumentar la frecuencia de semillas endógamas, provocando una disminución del fitness debido a lo que se denomina "depresión por endogamia". Una segunda consecuencia, totalmente distinta, es la pérdida de variación genética, que puede reducir el potencial de las poblaciones para adaptarse a los nuevos retos de su entorno, como las enfermedades infecciosas o el cambio climático. Aunque la eliminación del agente causante del declive debería ser siempre prioritaria, tanto la depresión por endogamia como la pérdida de variación genética pueden conducir también a un mayor riesgo de extinción.

Una consecuencia potencialmente negativa de la fragmentación del hábitat de una especie es la restricción del flujo genético entre las pequeñas poblaciones restantes, lo que puede conducir al agotamiento genético y a la reducción del fitness individual (Charlesworth & Charlesworth 1999; Leimu et al. 2010; Angeloni et al. 2011). Las poblaciones pequeñas también se ven afectadas por la deriva genética, que puede provocar la fijación de alelos deletéreos recesivos, lo que lleva a la pérdida de la diversidad genética de la población y a una mayor reducción del fitness. Un gran número de investigaciones empíricas ha demostrado la relación causal entre la reducción de la diversidad genética, el aumento de la endogamia y la disminución del fitness en las poblaciones de plantas silvestres (revisado por Leimu et al. 2006 y en los árboles tropicales específicamente por Lowe et al. 2005).

El rescate genético es la suplementación de poblaciones genéticamente empobrecidas con nuevos individuos (o genotipos) con el propósito de aliviar la erosión genética (Thrall et al. 1998) y mejorar la viabilidad de la población (Tallmon et al. 2004; Pimm et al. 2006). Los estudios sobre plantas anuales y perennes de corta vida han demostrado que el flujo genético mediado por el polen entre poblaciones, y la introducción de nuevos individuos en una población, pueden mejorar varios componentes del fitness y aumentar la viabilidad de la población, un efecto que parece más pronunciado en poblaciones pequeñas. La polinización controlada también permite el cruce entre plantas que están aisladas y favorece la creación de una nueva composición genética. Los ensayos de cruces deben evaluar el efecto sobre diferentes componentes del fitness como el aumento en el cuajado de piñas, de semillas, tasas de germinación y supervivencia de las plántulas en comparación con los obtenidos en la polinización abierta que, como se ha puesto de manifiesto en este

proyecto, origina principalmente endogamia.

## 2.1 Ejecución de cruces controlados en *A. nebrodensis*

En abril de 2020, los árboles adultos de *A. nebrodensis* fueron objeto de un cuidadoso seguimiento, prestando especial atención a la apertura de las yemas, el desarrollo de las estructuras reproductivas y la floración completa. En 2020 la floración se produjo a principios de mayo y fue muy abundante, a diferencia de la del año anterior. Los 25 árboles reproductivamente maduros de la población natural produjeron conos masculinos y femeninos, algunos en gran cantidad. La polinización cruzada manual entre los árboles fue realizada por técnicos especializados que trabajan para Unipa.

Los conos masculinos maduros (y próximos a la dehiscencia; Fig. 4a) se recogieron por separado de los árboles individuales un poco antes de su apertura, se embolsaron en bolsas de papel y se almacenaron durante 2-3 días en bandejas de plástico en una sala controlada con un deshumidificador para evitar el desarrollo de mohos hasta su uso en las polinizaciones manuales. Los conos femeninos (Fig. 4b) se aislaron del polen externo antes de su apertura cuando alcanzaron 2-3 cm de longitud. Se utilizó para ello bolsas de tergal, un material hidrofóbico que permite la transpiración. Las bolsas se colocaron en posición vertical para que el cono siguiera creciendo después de la polinización (Fig. 4c). Dado que la floración se produce de forma escalonada, fue necesario supervisar el desarrollo de los conos femeninos en cada uno de los árboles para proceder adecuadamente en función de su desarrollo. Las plantas situadas a menor altura suelen florecer antes que las situadas a mayor altura.



Figura 4. Conos masculinos y femeninos (a y b) de *A. nebrodensis*. c) Conos femeninos aislados en bolsas de tergal para la realización de cruces controlados en los árboles madre nº 16 y 17.

Cuando los conos femeninos se abrieron se introdujeron en el interior de las bolsas entre 10 y 15 conos masculinos maduros en función de la combinación de cruces. El movimiento natural de la bolsa debido al viento favorece la liberación y dispersión del polen de los conos dentro de la bolsa, permitiendo la polinización de los conos femeninos.

Para cada árbol polinizado, se registró el número de bolsas y el número de conos de cada bolsa, indicando la planta que proporcionó el polen. Se utilizaron 174 bolsas en 24 árboles y se protegieron 488 conos femeninos del polen externo. Los cruces se realizaron según 27 combinaciones diferentes de progenitores, en función de la distancia geográfica entre los árboles parentales (ya que en 2020 aún no se disponía de resultados sobre la distancia genética entre los árboles). El desarrollo de los conos en el interior de las bolsas se supervisó durante el verano a intervalos de 15 días. La maduración de los conos se produjo regularmente y las bolsas se retiraron a finales de septiembre para recoger los conos antes de que se desarticularan y extraer las semillas en octubre (Fig. 4e). Las semillas se extrajeron por separado de los conos y se sembraron en el vivero forestal de Piano Noce a partir de diciembre.



Figura 4e. Conos maduros de *A. nebrodensis*

En 2021 los árboles no desarrollaron conos florales por lo que no se pudieron realizar polinizaciones manuales. En mayo de 2022 los árboles volvieron a producir conos florales, aunque en menor magnitud que en 2020, y los cruces controlados volvieron a ser factibles. Esta vez, las combinaciones parentales se basaron en las distancias genéticas entre plantas, tal y como resultó del estudio sobre la genética de la población basado en el genotipado de SNPs. En total se realizaron 23 combinaciones de cruces utilizando 121 bolsas para embolsar 389 conos femeninos (Tab. 1).

TIPO DE CRUCE	PARENTAL 1	PARENTAL 2
Cruce 1	19M	26M
Cruce 2	11M	19M
Cruce 3	17M	31M
Cruce 4	9M	30M
Cruce 5	31M	32M
Cruce 6	21M	30M
Cruce 7	7M	32M
Cruce 8	8M	9M
Cruce 9	8M	19M
Cruce 10	16M	30M
Cruce 11	10M	27M
Cruce 12	30M	31M
Cruce 13	22M	7M
Cruce 14	7M	30M
Cruce 15	25M	28M
Cruce 16	21M	22M
Cruce 17	1M	22M
Cruce 18	18M	9M
Cruce 19	27M	25M
Cruce 20	1M	29M
Cruce 21	8M	12M
Cruce 22	24M	28M
Cruce 23	4M	25M
Cruce 24	25M	26M
Cruce 25	2M	14M
Cruce 26	21M	32M
Cruce 27	13M	15M
Cruce 28	27M	24M
Cruce 29	10M	30M
Cruce 30	19M	28M

Tabla 1. Lista de los 30 cruces recomendados entre árboles adultos de *A. nebrodensis* ordenados por la coancestría más distante y, por tanto, cruces más convenientes para aumentar la diversidad genética. Las plantas con un origen sospechoso se han resaltado con letra roja. Entre los cruces recomendados también se incluyen individuos no reproductivos en la actualidad pero que puede producir conos florales en un futuro.

Las semillas obtenidas por polinización manual en 2020 se sembraron en la segunda y tercera década de diciembre del mismo año. La siembra se realizó en bandejas de siembra, cada una de las cuales contenía 35 celdas (5x5x12 cm). Se sembraron cinco semillas en cada celda. El número de bandejas utilizadas en diciembre fue de 140, para un número total de 24.500 semillas sembradas. La germinación comenzó en los primeros días de marzo de 2021. En mayo de 2021, el porcentaje de semillas germinadas oscilaba entre el 10% y el 60% entre los distintos árboles madre y fue superior a la registrada en las semillas de polinización abierta recogidas de los mismos árboles madre (Fig. 5).



Figura 5. Fases de la germinación de las semillas de *A. nebrodensis* en las bandejas de plántulas situadas en el vivero "Piano Noce" (Polizzi Generosa).

El tamaño de los conos también resultó diferente entre los árboles madre, oscilando entre 9 y 16 cm de longitud y entre 13,5 y 16 cm de circunferencia. El peso de las semillas recogidas también fue notablemente diferente entre las distintas combinaciones parentales: de 13 g a 873 g. El genotipado de una muestra de semillas obtenidas de los cruces controlados será útil para evaluar el éxito de las polinizaciones manuales y descartar la posibilidad de contaminación polínica.

En abril de 2021 se realizó una nueva siembra con 184 bandejas de plántulas y 32200 semillas. Así, un total de 56000 semillas derivadas de cruces controlados fueron sembradas en el vivero. Actualmente, debido a la baja tasa de semillas llenas, al bajo índice de germinación, a las pérdidas fisiológicas y a los daños causados por los roedores, el número de plántulas derivadas de polinización manual que crecen en el vivero es de unas 5000. Estas plántulas seleccionadas representan nuevas reservas genéticas y se utilizarán en las parcelas de reforestación previstas en el proyecto, pensadas como núcleos de redifusión de la especie. La conservación de *A. nebrodensis* puede mejorar si se establece una estrategia adecuada para mejorar el acervo genético y promover el dinamismo futuro de la especie en relación con las presiones bióticas y abióticas.

## CAPITULO 3

### Producción de plantas sanas y genéticamente seleccionadas en el vivero

Uno de los principales objetivos del proyecto Life4fir es la selección de plántulas xenógamas para su posterior desarrollo en el vivero en condiciones óptimas, a fin de obtener material sano y vigoroso que se utilizará para la construcción de los nuevos núcleos de reforestación previstos en el proyecto. Para lograr este objetivo, es necesario aplicar en el vivero una serie de actividades y medidas. En el marco del proyecto Life4fir, la producción de estas plantas se lleva a cabo en el vivero forestal "Piano Noce" y se utilizarán con fines de reforestación en las zonas de propiedad pública de Sicilia. El vivero se encuentra en Polizzi Generosa, dentro del Parque Regional de Madonie, a pocos kilómetros de la población natural de *A. nebrodensis*. El vivero está dirigido por el DRSRT (Departamento Regional de Desarrollo Rural y Territorial) de Sicilia, que es beneficiario del proyecto Life4fir.

La propagación y desarrollo de las plántulas de *Abies nebrodensis* es una actividad que se lleva a cabo desde hace años el vivero "Piano Noce" con el apoyo de anteriores proyectos destinados a la conservación de esta especie. Al comienzo del proyecto, más de 25.000 plántulas de *A. nebrodensis* crecían en el vivero.

Uno de los principales requisitos del Life4fir, es la producción de plántulas sanas y vigorosas, con una mayor variabilidad genética. Por esta razón, el Proyecto ha planificado una acción preparatoria destinada a verificar la tasa de germinación de las semillas, la incidencia de las alteraciones y la mortalidad, para identificar los factores bióticos y/o abióticos asociados a las pérdidas y daños observados y, eventualmente, aplicar las medidas correctivas adecuadas. El objetivo principal es definir y reducir el impacto de los factores que reducen la germinación de las semillas y limitan el crecimiento y el vigor de las plántulas en maceta. Una serie de test permitieron evaluar la germinación y el crecimiento de las plántulas en el vivero, para caracterizar cualquier estrés y desorden biótico y abiótico e implementar medidas adecuadas de mitigación y control.

#### **3.1 Evaluación de la germinación y la tasa de supervivencia tras el trasplante**

En el vivero forestal "Piano Noce" se cultivaban en macetas más de 25.000 plantas de *Abies nebrodensis* al inicio del proyecto. Las plantas procedían de siembras realizadas desde 2003 a partir de semillas de polinización libre recogidas durante los primeros diez días de octubre de los individuos adultos que se desarrollan en la población natural. Cada piña se recogía por separado antes de que se desarticulara, y se almacenaban en condiciones secas y aireadas. La siembra se realizaba en la primavera siguiente (marzo-abril) colocando 10-15 semillas en macetas de vivero de 9,5 x 16,5 cm, sobre un sustrato formado por tierra agrícola mezclada

con arena. La materia prima utilizada en la mezcla procedía de lugares desconocidos y el sustrato se preparaba sin un procedimiento estandarizado. La primavera siguiente se realizaba el trasplante de las plántulas en macetas de vivero de 14,5 x 24,5 cm en suelo agrícola (Fig. 6). La tasa de germinación variaba según la planta madre de la que procedían las semillas, pero en general era baja y después del trasplante la tasa de mortalidad de las plántulas era aproximadamente del 90%. Por lo tanto, surgió la necesidad de desarrollar un sistema de cultivo de *Abies nebrodensis* que tuviera en cuenta parámetros físicos y químicos estandarizados y mejoraran tanto la germinación de las semillas como la supervivencia de las plántulas. dado lugar a una escasa regeneración de la población. La conservación de los recursos genéticos y los programas de mejora vegetal requieren una evaluación de la diversidad y la estructura genética de esta especie en peligro de extinción.



Figura 6. Trasplantado plántulas de *A. nebrodensis* en macetas de vivero de cine en el vivero Piano Noce.

### **Porcentaje de semillas llenas**

En el IBE-CNR se ha desarrollado un procedimiento basado en el uso de un dispositivo de rayos X (Gilardoni radiolight) para evaluar el porcentaje de semillas llenas y seleccionar las viables para su uso en reforestación. En las semillas de polinización abierta recogidas en 2021 de 11 árboles adultos de la población natural de *A. nebrodensis* el porcentaje de semillas llenas osciló entre el 0 (obtenido para el árbol nº 19) y el 54% (obtenido para el árbol nº 7) con un valor medio estimado en el 31,7%.



## Análisis del sustrato

Se realizaron análisis químico-físicos de las muestras de suelo para verificar las características de la mezcla utilizada para la germinación y el cultivo en macetas de las plantas de *Abies nebrodensis* en el vivero Piano Noce. Se analizaron los siguientes parámetros de las muestras de suelo: pH, conductividad eléctrica (CE) basada en el extracto de pasta saturada, materia orgánica y contenido total de carbonatos. Se comprobó que las muestras de suelo de las plantas en maceta variaban en los niveles de salinidad (CE) y en el contenido total de carbonatos. Así, surgió la necesidad de estandarizar la preparación del sustrato utilizado para la siembra y el trasplante para una mejor adaptación a los requerimientos de las plantas de *A. nebrodensis*: un pH de 5,5-6, una adecuada capacidad de retención de agua y aire, una alta porosidad, y una buena concentración de materia orgánica. Entre los 4 sustratos ensayados, el mayor porcentaje de germinación se observó con el suelo Vigorplant completo, adicionado con Agriperlita (en la proporción 70 lt + 10 lt) (Fig. 7), con el que se obtuvo un porcentaje de germinación entre el 20 y el 80%, con un promedio del 31,4%.



Figura 7. Suelo Vigorplant Completo adicionado con Agriperlita

## Utilización de bandejas para la siembra

La elección de las bandejas se basó en algunos factores como la facilidad de manejo en el vivero, la buena germinación, la alta densidad de plántulas por metro cuadrado, el bajo requerimiento de espacio y, sobre todo, el menor estrés de trasplante. Este último adquiere una importancia considerable, ya que se han registrado pérdidas de más del 90% en el trasplante (Raimondo, F., & Schicchi, R. 2005). En efecto, la extracción de las plántulas provoca frecuentemente la rotura de la raíz pivotante con la consiguiente muerte.

La siembra en bandejas evita este tipo de problemas ya que el cepellón (raíces y suelo) permanece intacto y las raíces no se ven afectadas negativamente. En cada celda individual de las bandejas se colocaron 5 semillas para su germinación (Fig. 8 y Tab. 2).



Figura 8. Siembra de semillas de *A. nebrodensis* en el vivero "Piano Noce".

CARACTEREÍSTICAS		TIPO 350
Tamaño de la bandeja	cm	30,0 x 48,5
Número de celdas	n.	35
Tamaño de las celdas	c.c.	350
Tamaño mayor de las celdas	cm	6,1 x 5,8
Tamaño menos de las celdas	cm	3,4 x 3,8
Profundidad	cm	16
Grosor	mm	1,6
Cloro		negro
Nº plántulas / m <sup>2</sup>	n.	240

Tabla 2. Características de bandejas utilizados para la siembra en vivero de *A. nebrodensis*

### 3.2 Aparición y frecuencia de los trastornos

Para cada parcela, planta madre, año de siembra, etc., se contaron las plantas y se sometieron a una inspección visual para identificar la existencia de órganos dañados, y se registró el número de plantas muertas. También se registraron los diferentes tipos de síntomas observados, su frecuencia y su impacto (en términos de porcentaje de corona dañada). Esto permitió obtener una imagen del tamaño de cada progenie y de la frecuencia de los síntomas observados entre las progenies y dentro de ellas (Tabla 3).

	Parcela 1		Parcela 14		Parcela 15		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<b>mortalidad</b>	459	5,04	7	0,34	142	1	608	2,4
<b>Acículas rojizas</b>	145	1,6	10	0,5	117	0,81	272	1,07
<b>clorosis</b>	190	3,82	17	0,84	764	5,35	971	3,82
<b>desfoliación</b>	9	0,1			35	0,24	44	0,17
<b>Acículas pequeñas</b>					6	0,04	6	0,02
<b>Brotos marchitos</b>	12	0,13	4	0,19	8	0,08	24	0,1
<b>Crecimiento atrofiado</b>			47	2,32	64	0,45	111	0,43

Tabla 3. Frecuencia (como número y porcentaje) de los principales síntomas observados en la partes aéreas de las plántulas que se desarrollan en tres parcelas del vivero.

### 3.3 Muestras para el aislamiento de hongos

Se tomaron muestras de acículas y ramas afectadas de las plantas enfermas para su posterior observación en el laboratorio. Las muestras se inspeccionaron cuidadosamente para definir en detalle los signos de colonización por patógenos (tejidos de reacción, cuerpos fructíferos de hongos, etc.) y para aislar in vitro los microorganismos fúngicos. Los aislamientos se realizaron a partir de acículas (enrojecidas, total o parcialmente necrosadas) y de brotes, previa esterilización de la superficie. Las colonias obtenidas se agruparon en morfotipos en función de sus características culturales. Los morfotipos fúngicos se distinguieron por su morfología (micelio y estructuras reproductivas) y por la secuenciación de regiones específicas del ADN genómico utilizadas para su valor diagnóstico (ITS1-ITS4).

### 3.4 Evaluación de los patógenos del suelo

La clorosis y la defoliación de las plantas son síntomas genéricos que pueden deberse a diversas causas, tanto bióticas como abióticas (estrés ambiental). El medio de cultivo de las plantas en maceta es una mezcla de tierra vegetal, turba y arena. Este sustrato puede albergar microorganismos patógenos (hongos, bacterias, nematodos) o, si las macetas se colocan en el suelo, los microorganismos nocivos pueden pasar al interior de la mezcla de las macetas y dañar las plantas. El comercio de plantas ornamentales está reconocido como

una de las principales vías de introducción de patógenos vegetales exóticos.

La acción de oomicetos peligrosos del suelo, como *Phytophthora* sp., no se puede descuidar en el entorno del vivero. Este oomiceto ataca el sistema radicular de las plantas provocando un deterioro generalizado de la copa (retraso en el crecimiento, clorosis, defoliación). Por esta razón, se deben realizar aislamientos en el laboratorio a partir de muestras de suelo y de raíces recogidas en las macetas de las plantas afectadas por clorosis, defoliación, marchitamiento y deterioro general. Se debe prestar especial atención cuando los síntomas de decaimiento y muerte se extienden a una zona o parcela del vivero, afectando a plantas contiguas.

La presencia de *Phytophthora* puede determinarse mediante el uso de cebos tradicionales y el aislamiento del suelo, los restos orgánicos y las raíces. La amplificación por PCR utilizando los cebadores ITS4 e ITS6 y la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del gen del ADN ribosómico son útiles para la detección de *Phytophthora*.

Entre los hongos patógenos que residen en el suelo de los viveros forestales también son frecuentes *Cylindrocarpon* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Pythium* spp., *Rosellinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp.

### 3.5 Mediciones ecofisiológicas

Las relaciones hídricas pueden determinarse en muestras de plantas en maceta tomadas del vivero para evaluar la aparición de estrés hídrico. Para obtener las curvas de presión-volumen (PV) se pueden realizar mediciones en verano y otoño. En ecología, las curvas presión-volumen describen la relación entre el potencial hídrico total ( $\Psi_t$ ) y el contenido relativo de agua (R) de los organismos vivos. Estos datos pueden ser útiles para determinar las condiciones de riego correctas para las plantas.

En el caso de *Abies nebrodensis* se tomaron muestras en julio y noviembre de dos grupos de plantas de diferente edad, 10-12 años y 4 años, cada uno de los cuales comprendía 5 plantas. Las curvas presión-volumen se obtuvieron siguiendo el método de deshidratación en banco, utilizando ramas del mismo año de tamaño comparable entre las diferentes muestras. Se registraron los valores del potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia ( $\Psi_{tp}$ ) y del potencial osmótico en plena turgencia ( $\pi_0$ ). Se crearon cuatro curvas de PV para cada grupo de edad. Los resultados indicaron que las plantas más jóvenes (4 años) no eran más susceptibles a la deshidratación que las plantas de 10-12 años. Además, entre julio y noviembre, las plantas en maceta de ambos grupos de edad no habían puesto en marcha mecanismos de osmorregulación para adaptarse a una escasez de agua. Así pues, durante el lapso de tiempo considerado, las plantas muestreadas en el vivero no se vieron afectadas por la escasez de agua y el régimen de riego puede considerarse bueno.

### **3.6 Micorrización**

La micorriza, que significa "hongo-raíz", se define como una relación beneficiosa o mutualista entre un hongo y las raíces de su planta huésped que aparece en aproximadamente el 90 % de los taxones vegetales. En esta relación la planta suministra azúcares y carbono al hongo y recibe a cambio agua y/o nutrientes minerales. Este tipo de relación ha existido desde que las plantas aparecieron en la tierra hace unos 400 a 500 millones de años. Existen varios miles de especies diferentes de hongos micorrícicos.

#### **Tipos de hongos micorrícicos**

Las micorrizas se clasifican en tres tipos según la ubicación de las hifas fúngicas en relación con los tejidos de la raíz. En las endomicorrizas los hongos producen hifas en el interior de las raíces en los espacios intra e intercelulares; en las ectomicorrizas la infección fúngica se extiende entre las células de las capas externas de las raíces y en las ectoendomicorrizas los hongos invaden las raíces colonizando las capas externas de las células corticales de forma inter e intracelular. Los intercambios tróficos tienen lugar en los lugares de contacto entre las células y las hifas. En las micorrizas arbusculares (MA), el tipo más común de hongos endomicorrícicos (ME) que afecta a la mayoría de las especies vegetales de interés agrícola, las hifas invaden las células de la corteza de la raíz sin dañar la membrana celular, ramificándose dicotómicamente y produciendo una estructura similar a la de un pequeño árbol, llamada arbusculo. Estas estructuras se consideran el principal lugar de intercambio entre el hongo y el huésped.

#### **Beneficios**

Los hongos endomicorrícicos benefician a la mayoría de las plantas del mundo. Los hongos ectomicorrícicos, que representan alrededor del 3% de las micorrizas, son más evolucionados y benefician principalmente a las especies leñosas y arbóreas. En total, los hongos micorrícicos benefician a entre el 80 y el 90 por ciento de todas las especies vegetales.

Entre las plantas que no responden a las micorrizas se encuentran algunas Brassicaceae, Caryophyllaceae y algunas otras especies. El principal beneficio que aportan los hongos micorrícicos es el acceso a una gran cantidad de agua y nutrientes (especialmente nitrógeno, fósforo, zinc, manganeso y cobre). Esto se debe a que las hifas aumentan la superficie de absorción de las raíces del suelo. Las hifas de las micorrizas tienen un diámetro menor que el de las raíces de las plantas y pueden llegar a zonas no disponibles para las raíces. Otros beneficios de las micorrizas son: mayor resistencia a los patógenos, mayor tolerancia a la sequía y al estrés por salinidad, mayor éxito en el trasplante, mayor rendimiento de los cultivos con una mejor floración, mayor absorción de agua y nutrientes, y mejor estructura del suelo.

## Uso, productos y coste

Las micorrizas tienen muchos usos, incluyendo viñedos/huertos, viveros, cultivados comerciales, paisajes, propietarios de viviendas o para proyectos de recuperación de tierras. El uso de hongos micorrícicos también es popular en la producción ecológica. En algunos casos, los hongos micorrícicos pueden inocularse artificialmente en la planta huésped para obtener los cuerpos fructíferos (trufa, *Boletus* spp., *Amanita caesarea*, etc.). Es importante señalar que las micorrizas pueden encontrarse en la mayoría de los suelos de forma natural, por lo que podría no ser necesario comprar micorrizas. Sin embargo, la mayoría de los medios sin suelo no contienen micorrizas, por lo que podrían incorporarse si las plantas se cultivan en contenedores. Los hongos micorrícicos pueden encontrarse en forma de granulado, polvo o en solución concentrada.

## Aplicación

La aplicación de los hongos micorrícicos puede realizarse como infección directa de esquejes o tacos durante el trasplante, incorporándolos al medio o al suelo o aplicándolos a través del riego. El inoculante puede reproducirse con circunstancias ideales, como la adición de mantillo y compost. Hay que evitar el riego excesivo y las aplicaciones excesivas de fertilizantes. Sin embargo, el riego, la cosecha y la rotación de cultivos pueden influir en la combinación raíz-hongo. Algunos hongos pueden colonizar nuevas raíces en una semana, mientras que otros pueden tardar hasta un mes.

Uno de los objetivos del proyecto Life4fir es la micorrización de plántulas obtenidas por polinización cruzada manual y cultivadas en macetas. En ausencia de datos científicos sobre la micorrización de *Abies nebrodensis*, se seleccionó el basidiomiceto *Pisolithus tinctorius* (Pers.), conocido como simbionte ectomicorrícico en *A. nebrodensis* y especies relacionadas como *A. alba* y *A. cephalonica* (Castellano & Trappe, 1991; Rincón et al., 2001; Krajin̄ a'kova' et al., 2012). Este gasteromiceto epigeo se caracteriza por la elevada producción de cuerpos fructíferos durante todo el año y la gran cantidad de basidiosporas que germinan fácilmente en presencia de las raíces de las plántulas. Estas características lo convierten en un simbionte mutualista ideal también en los ensayos de inoculación artificial y en las formulaciones ectomicorrícicas comerciales. Además, para el almacenamiento a largo plazo del inóculo fúngico, los cuerpos fructíferos de *P. tinctorius* pueden deshidratarse bajo flujo de aire a temperatura ambiente durante 48 horas y almacenarse hasta los ensayos de inoculación. En este caso, las esporas deben reactivarse en agua destilada esterilizada y mantenerse a 4°C durante 12-18 horas antes de la inoculación de las plántulas. Para facilitar la interacción entre los dos simbiontes, se recomienda la inoculación con suspensión de esporas durante el trasplante.

La inoculación de plántulas de un año de *A. nebrodensis* se realizó durante el trasplante en invierno (diciembre de 2021). En detalle, 20 ml de suspensiones de esporas de *P. tinctorius* a una concentración de 107 esporas por planta se inyectaron directamente sobre los sistemas

radiculares de las plántulas (Rincòn et al., 2001) (Fig. 9).



Figura 9. Inoculación de esporas *P. tinctorius* en suspensión en las plántulas trasplantadas de *A. nebrodensis*.

Las plántulas se trasladaron a un invernadero y se regaron constantemente para acelerar la colonización fúngica. A finales del verano de 2022 (principios de septiembre) se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de la micorrización. Se midieron varios parámetros para comprobar los efectos de la micorrización: estado general de crecimiento, altura de las plántulas (=distancia del cuello de la raíz a la yema apical), diámetro del cuello de la raíz, índice de micorrización (IM= número de puntas totales/longitud de los fragmentos de la raíz), y peso seco del sistema radicular y de la parte aérea. Las plántulas inoculadas mostraron un color verde intenso de las acículas y un mejor crecimiento vegetativo cuando desarrollaron la primera rama lateral, en comparación con las plántulas no inoculadas. En promedio, las plántulas inoculadas resultaron más altas que las no inoculadas (alrededor de 1,5 cm de diferencia de altura), con un cuello de la raíz más grueso (2 mm frente a 1 mm) y un IM más alto (7,84 frente a 6,25). En consecuencia, se detectaron diferencias en el peso seco de las plántulas inoculadas y los controles. De hecho, la parte aérea y el sistema radicular de las plántulas inoculadas eran dos y tres veces más pesados que los no inoculados, respectivamente.

## CAPITULO 4

### Estudio fitosanitario de los árboles de *Abies nebrodensis* y control de los estreses bióticos y abióticos

El seguimiento del estado de salud de las zonas forestales naturales proporciona conocimientos básicos sobre las amenazas que se producen, así como sobre las medidas de protección y conservación adecuadas. Además, la información recopilada puede proporcionar pistas para comprender la influencia de perturbaciones, como el cambio climático y las especies invasoras, en los ecosistemas forestales. Los impactos del cambio climático en los bosques ya se han observado en Europa y los bosques más vulnerables se encuentran en el Mediterráneo, donde las temperaturas más cálidas aumentarán el riesgo de incendios forestales, brotes de plagas y desertificación. Existe la preocupación de que la mortalidad de los árboles aumente debido al estrés fisiológico, los brotes de insectos y los incendios forestales provocados por el futuro cambio climático.

En el contexto de la conservación de especies amenazadas, el seguimiento es esencial para detectar las tendencias de abundancia y distribución a lo largo del tiempo, medir los impactos de los procesos de amenaza y evaluar la eficacia de las respuestas de gestión (Legge et al. 2018). Un seguimiento eficaz puede aportar información imprescindible para la toma de decisiones de gestión de cara a mejorar la conservación de las especies amenazadas (Lindenmayer et al. 2013). La frágil existencia de las especies amenazadas exige además que el seguimiento tenga la precisión y la sensibilidad adecuadas para detectar cambios sutiles en las poblaciones y así poder informar sin demora sobre las decisiones importantes de la gestión futura (Martin et al. 2007, 2012). Los marcos de seguimiento y gestión deben empezar por definir y delimitar el problema (o los problemas) que afectan a una especie. Estos pasos iniciales se centran en el desarrollo de objetivos compatibles de seguimiento y gestión de la conservación, y en la descripción de las acciones y estrategias de gestión existentes y potenciales.

A la hora de diseñar un programa adecuado, podrían investigarse enfoques innovadores con datos específicos que permitan métodos más rentables. Por ejemplo, los avances en la tecnología de los drones pueden facilitar una mayor precisión en la toma de datos (Hodgson et al. 2016), y además el eDNA ha demostrado ser una herramienta eficaz en el seguimiento de algunas especies amenazadas o en peligro de extinción (Thomsen et al. 2012); ambas técnicas prometen beneficios altamente rentables.

#### **4.1 Seguimiento de los árboles de *A. nebrodensis* en el marco de Life4fir**

La acción C1 del proyecto Life4fir "Apoyar y preservar *Abies nebrodensis* en su hábitat natural" se basa en una serie de actividades destinadas a la preservación de los árboles relictos de esta población natural única mediante el seguimiento y el control de sus amenazas (conservación in-situ). Entre ellas se encuentran los estudios realizados dentro



de la subacción C1.5 "Análisis espacial y sanitario de la población natural de *A. nebrodensis* mediante tecnología de drones":

Además de la amenaza que suponen para *A. nebrodensis* los herbívoros silvestres (especialmente los gamos y los jabalíes), a lo largo de los años se han observado esporádicamente afecciones en las copas de los árboles (Fig. 10).



Fig. 10. Ejemplos de enrojecimiento de las agujas y desecación en la corona de *A. nebrodensis* en la población natural.

El proyecto Life4fir ha servido para describir los síntomas, investigar sobre las causas de las alteraciones observadas y seguir su evolución en relación con las condiciones ambientales y el cambio climático. El proyecto ha previsto la realización de estudios fitopatológicos en la población natural para detectar y vigilar la aparición y el alcance de las alteraciones bióticas o abióticas y, eventualmente, aplicar medidas de control adecuadas. El seguimiento de las condiciones sanitarias mediante estudios periódicos también tiene como objetivo evaluar el efecto de las medidas de protección que se aplicarán a los árboles relictos en el curso del proyecto. Los estudios sobre el estado de salud de las plantas se basan en inspecciones visuales de los árboles individuales junto con análisis multiespectrales de toda la copa para supervisar posibles trastornos fisiológicos.

## 4.2 Inspecciones y muestreos de los árboles

Los árboles fueron sometidos anualmente a un cuidadoso examen visual para evaluar su estado de salud, observando la forma y transparencia de la copa, el giro del follaje, la presencia de partes declinantes, desecadas o dañadas, y la aparición de lesiones. Los trastornos observados en las copas se describieron por separado, registrando el tipo de órgano afectado (tronco, ramas, ramillas, brotes, 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), y el impacto en términos de porcentaje de copa dañada.

Los análisis de laboratorio se realizaron sobre las muestras recogidas mediante observaciones al estereomicroscopio, aislamiento y cultivo de las colonias de hongos y su caracterización genética mediante amplificación por PCR y secuenciación de los loci objetivo (Fig. 11). Esto permitió identificar la microflora fúngica asociada a los trastornos observados y, eventualmente, detectar la presencia de patógenos nocivos.

Los estudios realizados permitieron agrupar las plantas de la población natural en función del grado del follaje dañado, de la posición de los síntomas en la copa y sobre la base de los principales tipos de síntomas observados (brotes y ramillas enrojecidas, defoliación, heridas debidas a los herbívoros, pocas hojas y clorosis, desecación de ramillas y pequeñas ramas). Los aislamientos de hongos permitieron excluir la participación de patógenos agresivos como causa de los trastornos observados. Todos los hongos aislados se clasificaron como patógenos débiles, endófitos o saprófitos, cuyo desarrollo en la planta está asociado a las perturbaciones ambientales a las que están sometidos los árboles en su hábitat natural, como la sequía estival, las heladas tardías, las altas temperaturas alcanzadas por las rocas desnudas durante el verano y la intensa radiación solar. Además hay que añadir los daños causados por los herbívoros silvestres, en particular los gamos, que se han reproducido masivamente en el territorio del Parque en los últimos años.

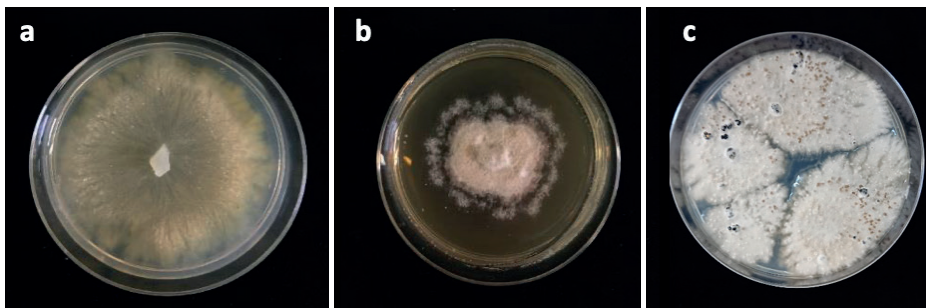


Fig. 11. Aislamientos fúngicos muestreados con mayor frecuencia en las acículas enrojecidas de *A. nebrodensis*. a) *Cytospora abietis* en placas PDA; b) *Rhizosphaera macrocarpa* en placas PDA; c) *Pestalotiopsis funerea* en placas PDA

### 4.3 Estudios sobre el microbioma fúngico

El microbioma vegetal (fitobioma), se define como un conjunto completo de genomas microbianos asociados a una planta huésped. La importancia de los microbios asociados a las plantas para la aptitud, la salud y la nutrición de la planta huésped está universalmente aceptada. En particular, ciertos hongos y bacterias promueven el crecimiento de las plantas y aumentan su resistencia al estrés. Múltiples estudios han demostrado también que los daños causados por los herbívoros en los ecosistemas forestales están claramente influidos por las interacciones tripartitas entre los árboles, los insectos y sus microbiomas. Sin embargo, no todos los organismos simbióticos aportan beneficios al huésped, ya que las interacciones planta-microbioma también pueden ser neutras (lo que se conoce como comensalismo) o incluso perjudiciales para el huésped (parasitismo o patogeneidad).

En el proyecto Life4fir se está llevando a cabo la caracterización del microbioma fúngico en brotes y en las ramillas sanas y desordenadas de *A. nebrodensis* para desvelar la biodiversidad de los hongos epífitos y endofíticos que residen en el dosel en relación con diferentes condiciones fisiológicas de los tejidos y diferentes condiciones de emplazamiento de los árboles.

### 4.4 Estudios con vehículos aéreos no tripulados y análisis multiespectrales

La pérdida del bosque está fomentando el uso de nuevas tecnologías para detectar las zonas en las que las diferentes fuentes de estrés están haciendo mella. La tecnología de los drones puede utilizarse para evaluar la salud del bosque mediante diferentes imágenes de alta resolución, lo que permite un enfoque más rentable. El estrés biótico o abiótico de los árboles implica su desorden fisiológico y bioquímico, que a su vez modifica la radiación absorbida o reflejada por la copa. Las cámaras multiespectrales miden la radiación visible e infrarroja cercana reflejada por las plantas.

En la fase inicial del proyecto se ha realizado un estudio de los árboles de *Abies nebrodensis* y de los rasgos de "salud" de la vegetación circundante (índices espectrales) mediante tecnología de teledetección basada en el uso de un dron (UAV - Unmanned Aerial Vehicle) equipado con una cámara digital e imágenes hiperespectrales. Está previsto realizar un segundo estudio al final del proyecto para comparar el estado de salud del hábitat tras la aplicación de las medidas de protección previstas.

Para este estudio con drones se utilizaron dos cámaras: 1) Cámara convencional RGB. Las imágenes tomadas fueron geolocalizadas y se realizó una ortofoto del terreno y un Modelo Digital de Elevación para encontrar correlaciones entre los rasgos topográficos y la evolución de las tensiones, y 2) Cámara multiespectral para obtener 4 imágenes simultáneas, una por cada banda: Rojo, Borde Rojo, Verde, e Infrarrojo Cercano. A partir de estas imágenes capturadas, se crearon mapas de reflectancia que combinados permiten obtener diferentes índices de vegetación que están específicamente diseñados para obtener un valor de la cantidad o el vigor de la vegetación.

Los fotogramas (en RGB y en el espectro de verde, rojo, borde rojo e infrarrojo cercano) se alinearon y, mediante el procedimiento Structure from Motion (SfM), se creó una nube de puntos. Esta se utilizó para obtener la ortofoto y la producción de Modelos Digitales del Terreno (MDT) y de superficies (MDS), mediante el procedimiento de triangulación. El MDT (Modelo Digital del Terreno) reestructurado en 3D de la zona donde se encuentra la población natural de *A. nebrodensis* permitió informar de la distribución de los árboles en relación con la morfología del territorio (Fig. 12).



Fig. 12. Modelo digital del terreno en 3D de la población de *A. nebrodensis* distribuida a lo largo del Vallone Madonna degli Angeli, Monte dei Pini y Monte Cavallo.

Las ortofotos del área de distribución natural de *A. nebrodensis* pueden utilizarse como mapas, para medir distancias reales, para ser utilizadas en un Sistema de Información Geográfica, para combinar la imagen o los resultados de su procesamiento con otros mapas, o para comparar la imagen o los resultados de su procesamiento con puntos que representan la "verdad del terreno". Sólo para las imágenes multispectrales detectadas en el ROJO (Red), REG (Red Edge), VERDE (Green), NIR (Near Infrared), los mapas de reflectancia se produjeron tras la adecuada calibración de la cámara. Esto se hizo mediante el sensor de luz montado en el dron y utilizando los valores de reflectancia conocidos obtenidos del panel de calibración. El alto potencial de reflectancia de las hojas en el NIR permitió la evaluación de la defoliación del bosque a través de estos sensores. En un bosque sano, el 50% de la radiación es reflejada por el dosel forestal. La defoliación del bosque disminuye la reflectancia del NIR. Las imágenes infrarrojas muestran en rojo la reflectancia de la cubierta de los árboles. La reflectancia espectral se basa en la absorción de agua y en la clorofila de

la hoja. Hay varias tonalidades en la vegetación debido al tipo, la salud, la estructura de las hojas y el contenido de humedad de las plantas (Fig. 13).

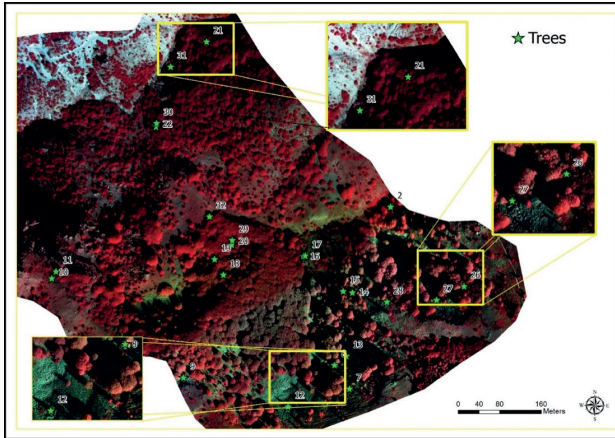


Fig. 13. Mapa infrarrojo de la zona 1 que incluye el núcleo principal de la población de *A. nebrodensis*, con algunos lugares ampliados en los que se pueden distinguir individuos de *A. nebrodensis*.

Las imágenes multispectrales se analizaron adecuadamente para la elaboración de un mapa NDVI. El NDVI es un indicador que describe el verdor, la densidad relativa y la salud de la vegetación para cada elemento de la imagen, o píxel, en una imagen de dron (Fig. 14).

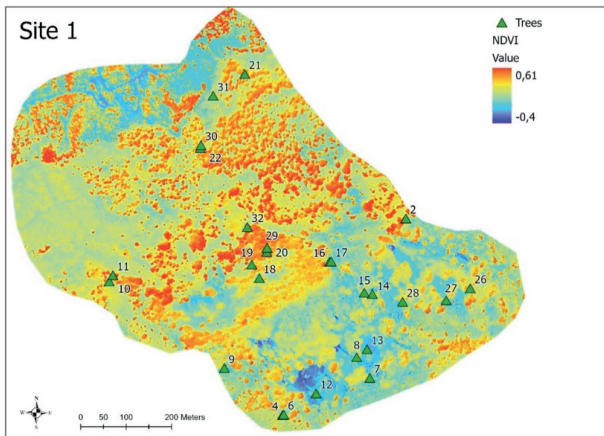


Fig. 14. Mapa de NDVI de la zona 1 que incluye el núcleo principal de la población de *A. nebrodensis*.

Los valores de NDVI pueden oscilar entre +1,0 y -1,0. El NDVI del hábitat de *A. nebrodensis* osciló entre -0,4 y +0,61 y las zonas en las que el índice fue superior a 0,5 (zonas rojas y naranjas), que corresponden a la presencia de vegetación densa, son bastante limitadas. Los mapas obtenidos son útiles para realizar una investigación comparativa del estado de salud de los árboles individuales en relación con las condiciones ambientales mediante un análisis de autocorrelación espacial. Si se lleva a cabo un segundo estudio con drones antes de que finalice el proyecto, los mapas multiespectrales también servirán para controlar la evolución en el tiempo del estado de salud de los árboles en función de las fluctuaciones climáticas y de las medidas que se apliquen.

## CAPITULO 5

### Sostenimiento de la regeneración natural

La regeneración natural es un proceso biológico que puede ser asistido y gestionado para aumentar la cubierta forestal y lograr la recuperación del ecosistema nativo, o de algunas de sus funciones. La restauración ecológica se basa en los procesos de regeneración natural para lograr la recuperación de los ecosistemas forestales. Además de mejorar la resiliencia y suministrar múltiples bienes y servicios del ecosistema, la regeneración natural puede ser muy eficaz para recuperar la biodiversidad local, las interacciones de las especies y el movimiento dentro de los paisajes.

Mediante la regeneración natural, la biodiversidad local se enriquece debido a 1) la propagación natural de árboles y arbustos por medio de semillas, brotes de raíz, tocones o matorrales; 2) la regeneración de fuentes genéticas locales adaptadas a las condiciones locales del suelo y el clima y 3) los polinizadores, herbívoros y agentes de dispersión de semillas asociados a los árboles colonizadores. Muchos de estos beneficios también pueden lograrse mediante enfoques de siembra directa y plantación de árboles, pero con un esfuerzo y unos costes significativamente mayores.

Para que se produzca la regeneración natural es necesario que se cumplan una serie de condiciones sociales, normativas y ecológicas. La regeneración natural puede producirse cuando se cumplen los siguientes factores ecológicos: bajos niveles de perturbación del suelo y retención de la capa superior del mismo; proximidad a remanentes o reservas forestales que permitan la colonización de la vegetación a partir de semillas dispersas, brotes de raíz o brotes de tallo; protección contra incendios, pastoreo y cosecha extensiva; presencia mínima de hierbas propensas al fuego, helechos, enredaderas leñosas y especies invasoras que puedan impedir el establecimiento de los árboles. Cuando no se den algunas de estas condiciones, puede ser necesario realizar una plantación de enriquecimiento, una escarda o una plantación intensiva para restaurar la cubierta forestal y sus cualidades. Las condiciones ecológicas favorables para la regeneración natural están asociadas a contextos sociales y normativos particulares para el uso de la tierra (informe de política da Feri).

#### 5.1 La regeneración natural de *Abies nebrodensis*

Varios factores limitan el crecimiento y establecimiento de la regeneración natural de la población de *Abies nebrodensis*: los suelos superficiales y rocosos, la floración y fructificación irregular a lo largo de los años, la alta tasa de autofecundación y el alto porcentaje de semillas vacías, y el impacto de los herbívoros silvestres que se comen las plántulas (Fig. 15).



Fig. 15. Conos maduros de *Abies nebrodensis* recolectados para la obtención de semillas

A menudo, la acción de las perturbaciones localizadas (acción excavadora de los jabalíes, pastoreo de los gamos y del ganado, etc.) ha dificultado el éxito de los plantones en el pasado reciente. En 2005, un censo realizado al final del anterior proyecto Life Natura (LIFE2000NAT/IT/7228) "Conservación in situ y ex situ de *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei", concluyó que la regeneración natural de *A. nebrodensis* en el área natural consistía en 80 plántulas de entre dos y más de 20 años, encontradas en las proximidades de ocho de las veinticuatro plantas de la población natural capaces de producir semillas. En el estudio realizado en 2014, se registraron once árboles madre con 274 accesiones. El aumento del número de plántulas detectado indica una inversión de la dinámica de la población de *Abies nebrodensis*. Las plantas jóvenes de regeneración natural crecen principalmente entre las plantas en forma de cojín de *Juniperus hemisphaerica* y *Genista cupanii*, donde encuentran condiciones microclimáticas favorables y protección contra los herbívoros. Además, la presencia de una capa de musgo aumenta el contenido de agua en el suelo, lo que es esencial para la supervivencia de las plántulas (Fig. 16).





Fig. 16. Plantas jóvenes de regeneración natural creciendo entre *Fagus sylvatica* y entre una capa de musgo

## 5.2 Censo y cartografía de los juveniles de regeneración natural

Se realizó el censo y la cartografía de los juveniles para rastrearlos y seguir su evolución, así como para optimizar la función protectora de los nuevos cercados. En el marco del proyecto Life4fir se realizaron prospecciones en verano y otoño de 2020 para la detección e identificación de regeneración natural de *Abies nebrodensis* en la población relicta. Para llevar a cabo inspecciones exhaustivas en el campo, se desarrolló un protocolo de censo. Se basó en la medición de la distancia en metros y el ángulo acimutal de cada planta o plántula a su respectivo árbol madre, mediante el uso de una brújula profesional. Se prepararon tablas de censo que contenían los parámetros que debían registrarse: nº del árbol madre (MP) y posición GPS, Id. de la plántula, distancia desde el MP, acimut, altura (cm), edad, estado vegetativo y sanitario, y cualquier otro dato de interés. Los datos recogidos se utilizaron para la realización de una base de datos completa y 15 mapas, uno por cada planta madre (Fig. 17).

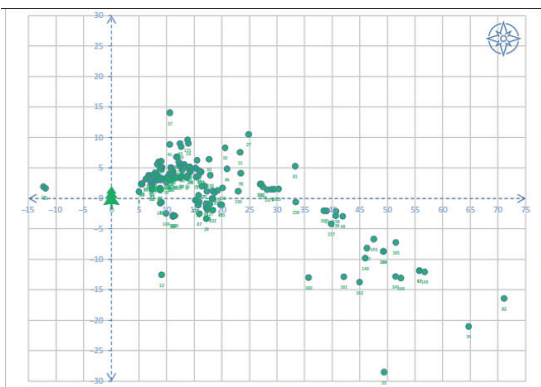


Fig. 17. Mapa de distribución de la regeneración natural de la planta madre nº 10.

Según las experiencias de los estudios anteriores, el último de los cuales se remonta a 2014, no se utilizaron estacas con etiquetas para marcar las plantas jóvenes. De hecho, las utilizadas en los censos anteriores se desprendieron y fueron masticadas por los ciervos después de unas semanas, ya que atraen a estos animales.

### 5.3 Consistencia y localización de la regeneración natural

El estudio de la regeneración natural permitió detectar y registrar un total de 484 plantas o plántulas de *Abies nebrodensis*, subdivididas entre 15 árboles madre. Estos datos son muy significativos si se tiene en cuenta que, en el censo anterior realizado en 2014, se registraron once árboles madre con 274 accesiones. De hecho, los nuevos informes se referían al árbol madre nº 2 con 3 accesiones; el nº 13 con 4 accesiones; el nº 20, con 31 accesiones y el nº 11, con 31 accesiones. Los árboles madre con el mayor número de plántulas registradas fueron el nº 10 (169 plántulas), el nº 22 con 83 plántulas, el 21 con 58 plántulas y el nº. 18 con 49 plántulas. Las plantas jóvenes tenían entre 1 y 24 años de edad (Tabla 4).

Mother tree (no.)	No. plants of the natural regeneration	No. of seedlings (age < 2 years)	No. tot natural regeneration	Plants already surveyed in 2014	Plants newly reported in the 2020 survey
1	24	5	29	13	16
2	3		3		3
6	2		2	2	
8	14	13	27	2	25
10	143	26	169	21	148
11	26	5	31		31
13	3	1	4		4
17	4		4	4	
18	40	3	43	35	8
20	4		4		4
21	3	55	58	1	57
22	73	14	87	38	49
23	1		1	1	
27	3		3	3	
29	8	11	19	7	12
<b>Tot.</b>	<b>351</b>	<b>133</b>	<b>484</b>	<b>127</b>	<b>357</b>

Tabla 4. Tabla resumen de la cantidad de la regeneración natural para cada árbol madre.

El análisis de los mapas de distribución mostró que alrededor de la mayoría de los árboles madre maduros *Abies nebrodensis* se ha establecido una regeneración natural de de lento crecimiento. Esta regeneración prefiere los lugares protegidos con mayor facilidad de enraizamiento, como los sitios sombreados y húmedos cerca de los hayedos, robledales o encinares, los arbustos de enebro en forma de almohada, los arbustos de Rowan, las capas de musgo y los salientes de los acantilados orientados al norte. La regeneración natural se encontró a distancias de hasta setenta metros de un árbol madre. Por ejemplo, la plántula

10/82 se encontró a 71 metros al sureste del árbol madre nº 10 (Fig. 5) y la plántula 8/23 se encontró a 65 metros cerca de un tocón de haya, a lo largo del camino situado aguas arriba del árbol madre nº 8 (Fig. 6).

Una comparación con los datos recogidos en el anterior estudio de 2014, ponen de manifiesto que las plántulas de *Abies nebrodensis* sufrieron a una tasa de mortalidad relevante. Por ejemplo, en el caso del árbol madre nº 22, se registraron cuarenta y siete plántulas de un año en 2014, mientras que en 2020 solo se encontraron 21 plantas con una edad compatible (5/7 años), lo que muestra una tasa de mortalidad del 55%. En cuanto al árbol madre nº 29, en 2014 se detectaron 28 plántulas de aproximadamente un año de edad (dispersas entre 5 y 34 m), además de 8 plantas bien establecidas. En 2020 se han encontrado 7 de las 8 plantas establecidas, pero ninguna de las registradas en 2014. En cambio, se encontraron 12 plántulas nuevas de menos de dos años. Por lo tanto, en este caso, se produjo una mortalidad del 100% de las plántulas.

#### **5.4 El nuevo sistema de vallas**

Para el establecimiento de la regeneración natural, los cercados establecidos alrededor de los árboles adultos de *A. nebrodensis* han tenido una importancia considerable, evitando la interferencia externa en los procesos de germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas. El primer sistema de vallas para la protección de los árboles relictos de *A. nebrodensis* se remonta a la década de 1950 y, debido a su deterioro con el paso del tiempo, fue sustituido por nuevas vallas construidas en los años siguientes. Las últimas vallas, fueron instaladas por el anterior proyecto LIFE-Natura 2000 "Conservación in situ y ex situ de *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei" realizado entre 2000 y 2005.

El proyecto Life4fir planificó la ampliación y el refuerzo de las vallas alrededor de los árboles para satisfacer dos necesidades básicas: 1) la mayoría de los vallados existentes volvían a mostrar signos de deterioro y estaban dañados por la masiva población de gamos y jabalíes, habiendo perdido gran parte de su funcionalidad; 2) se comprobó que muchas plántulas de la regeneración natural crecían fuera del perímetro de los vallados existentes y se necesitaban medidas de protección adecuadas contra los herbívoros; y 3) los vallados existentes eran a menudo invadidos por los ciervos y, por tanto, era necesario sustituirlos por vallados más altos. Así pues, se ha planificado e instalado un nuevo sistema de vallas para proteger mejor la regeneración natural en una superficie más amplia y ampliar la "zona protegida" para los árboles relictos de la población. Las nuevas vallas pretenden proteger a la población de *A. nebrodensis* también de la presión antropogénica y de los numerosos visitantes que recorren los senderos del Parque (y el espacio circundante) llegando a los árboles relictos.

Para apoyar la regeneración natural y la conservación de los microhábitats alrededor de los treinta árboles relictos, se ha aumentado la superficie protegida por las nuevas vallas de la fauna y la presión humana (de 1420 m<sup>2</sup> a 2144 m<sup>2</sup>). El nuevo sistema de vallas se ha

establecido para proteger la regeneración natural en una superficie mayor con el fin de aumentar la zona de amortiguación alrededor de los árboles. Esto preservará la biocenosis alrededor de cada árbol y, en consecuencia, favorecerá el desarrollo de la regeneración natural (Fig. 18).



Fig. 18. Vallas instaladas para proteger la población natural de *A. nebrodensis*.

Las nuevas vallas están hechas de postes de castaño con un diámetro superior no inferior a 7 cm y una longitud no inferior a 2,40 m. Antes de su instalación, se calafatearon por la parte inferior de 60 cm con alquitrán frío, se colocaron a 2 m de distancia entre sí y se insertaron durante 40 cm en el suelo.

La red metálica está hecha de alambre de hierro galvanizado de 1,60 m de altura con una malla degradante, con un peso mínimo de 0,70 kg por metro lineal. Se fijó (mediante alambre galvanizado) en cuatro órdenes de alambres de hierro galvanizado de 2,70 mm de diámetro, que se anclaron a los postes mediante grapas y se colocaron respectivamente a nivel del suelo, a 1,40 m, a 1,60 m y a 1,90 m del suelo. Cada valla está equipada con una puerta de entrada de 1,5 m de ancho, construida según el esquema previsto en el proyecto, tal como se muestra en la Fig. 19.

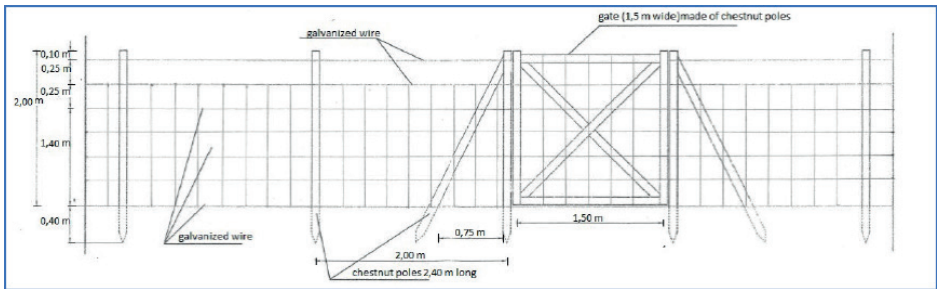


Figura 19. Diseño de las vallas según el proyecto.

Para la instalación de las vallas se compraron 1.800 postes de castaño, 5.000 kg de alambre de hierro galvanizado, 3.750 m de malla metálica y 24 juntas de hierro forjado para las puertas de madera. También se compraron otros herrajes consistentes en bisagras y cerraduras laterales y de suelo para las puertas. El perímetro (en metros lineales) de las vallas instaladas alrededor de los 30 árboles de *A. nebrodensis* se indica en la Tabla 1.

## 5.5 Medidas de gestión de la regeneración natural

A pesar de la alta tasa de mortalidad de las plántulas de *A. nebrodensis*, el aumento global de la regeneración natural mostró una expansión gradual en su hábitat en los últimos años. Esto ha ocurrido a pesar de la baja eficacia de las viejas y desgastadas vallas para proteger a los árboles madre y a las plantas jóvenes que crecen en su entorno. El origen real de la regeneración natural, especialmente las plántulas y los plantones que se encuentran a gran distancia del árbol madre más cercano, sólo puede evaluarse con los análisis genéticos. Sin embargo, el correcto censo de la regeneración natural, así como la actualización de la consistencia de la población de *A. nebrodensis* permitió abordar las opciones de gestión para la conservación de esta especie. En el marco de este proyecto, la detección y señalización de la posición real de cada una de las adhesiones ha tenido una importancia considerable para la gestión de la regeneración natural. De hecho, la retirada de las antiguas vallas y la reinstalación de las nuevas se llevó a cabo en junio de 2021 sin causar daños ni interferencias a las plantas y plántulas, que no son fácilmente visibles para las personas no acostumbradas a buscarlas. La instalación de las nuevas vallas reforzará la protección de las plántulas y los árboles madre de *A. nebrodensis* y se espera un nuevo aumento del número de plantas regeneradas naturalmente en los próximos años.

## CAPITULO 6

### Conservación ex situ del germoplasma de *A. nebrodensis*

La conservación ex situ del germoplasma de *Abies nebrodensis* ha sido planificada por el proyecto Life4fir para alcanzar diferentes objetivos: la creación de un huerto clonal, un banco de semillas y un criobanco. Estas medidas desempeñan un papel fundamental en la conservación del patrimonio genético de *A. nebrodensis*.

#### 6.1 Creación de un huerto clonal

El proyecto Life4fir ha previsto la creación de un huerto clonal. Su objetivo no es sólo una simple colección de germoplasma, sino también producir semillas en el futuro con una mayor variabilidad genética, ya que puede favorecer el cruce entre diferentes genotipos cuando alcancen la edad adulta. Esto necesita producir semillas con una amplia base genética. El huerto clonal también permitirá un seguimiento constante de los genotipos individuales (en cuanto a crecimiento, fenología, etc.), con fines científicos y de enseñanza. En el futuro, cuando las plantas alcancen su madurez, el huerto se utilizará como una nueva fuente de semillas en lugar de la población original, evitando los impactos negativos debidos a la recolección repetida en la población natural.

Para establecer esta colección de clones, cada genotipo individual de la población natural de *A. nebrodensis* debe ser propagado vegetativamente.

##### 6.1.1 Propagación por injerto

En las coníferas, la propagación vegetativa para la reproducción de "árboles plus", esto es árboles seleccionados o en peligro de extinción, se realiza tanto por esquejes como por injertos. En la propagación por esquejes, se tratan porciones de brotes de unos 10-15 cm en la base con preparados de talco, que contienen una auxina (generalmente, IBA), y se colocan para enraizar en un banco nebulizado. Esta es una técnica sencilla y a menudo eficaz, pero no con todas las coníferas. Las pruebas realizadas en el pasado ya pusieron de manifiesto el escaso potencial rizogénico de los esquejes de *Abies nebrodensis*. Una buena alternativa es la propagación por injerto, en la que una porción del brote se injerta en un patrón de semilla, convenientemente preparado. El injerto más utilizado en las coníferas es el "injerto de chapa". En este tipo de injerto, se prepara una porción apical de la rama de unos 10 cm con un corte de "pluma" de la base y ésta se inserta en una "bolsa" producida en el patrón, en posición lateral (Fig. 20a); a continuación, el injerto se tensa convenientemente con un elástico para facilitar el contacto de las partes regeneradoras (cambium del patrón y de la púa) y se protege el punto injertado de la deshidratación con papel de aluminio (Fig. 20b). Durante el primer periodo tras el injerto, las plantas injertadas se mantienen bajo bolsas de plástico (Fig. 20c) hasta que se produce la cicatrización del injerto (Fig. 20d). Esta técnica se utilizó

con material de árboles de *Abies nebrodensis* para la constitución del huerto clonal a fin de propagar vegetativamente la población natural.

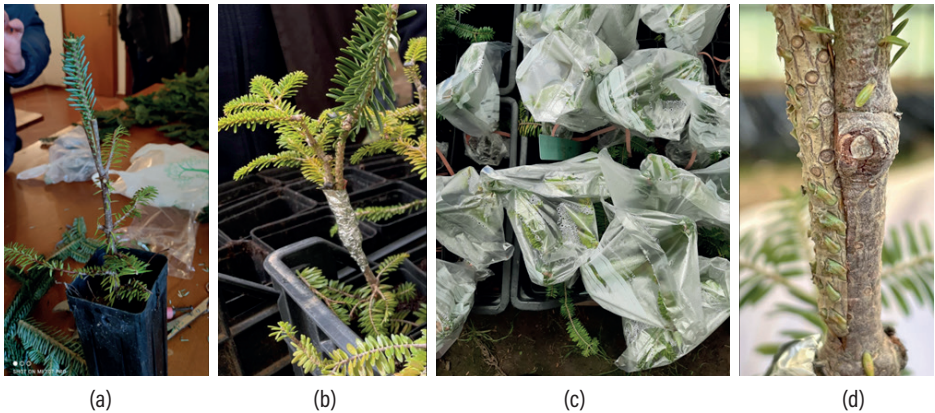


Fig. 20. El injerto de *Abies nebrodensis*

## 6.2 Banco de semillas

### 6.2.1 Objetivos de los bancos de semillas

Los bancos de semillas representan el sistema de conservación ex situ más utilizado para la conservación de la biodiversidad vegetal. Hasta la fecha, existen unos 1750 bancos de semillas en el mundo, gestionados por instituciones públicas y privadas, a menudo bajo el amparo de las organizaciones de conservación más importantes (como el CGIAR, Bioversity International, CIAT y otras). El "Segundo Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo para la Alimentación y la Agricultura" (SoWPGR-2) de la FAO informó de la existencia de más de 7.500.000 accesiones, principalmente de cereales y otras especies reproducidas por propagación vegetativa, conservadas con esta técnica. Los bancos de semillas funcionan a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ , manteniendo las semillas dentro de contenedores de vidrio o plástico. El tiempo máximo de almacenamiento depende estrictamente de la especie, pero suele alcanzar muchas decenas de años, durante los cuales se repiten periódicamente las pruebas de germinación y viabilidad. Para lo anterior, las semillas de los 30 árboles de *Abies nebrodensis* se conservarán en el Banco de Semillas establecido en el MAN (Museo dell'*Abies nebrodensis*) en el Municipio de Polizzi Generosa.

Para las coníferas, y por tanto para *A. nebrodensis*, el almacenamiento de semillas a baja temperatura es un sistema importante y válido de conservación de germoplasma, pero la gran presencia de semillas vacías, junto con las viables, puede ser un problema para la conservación. Por lo tanto, aplicamos el análisis de rayos X para detectar y eliminar las semillas vacías.

## 6.2.2 Selección de semillas llenas

Se utilizó un aparato de rayos X para analizar las semillas de *Abies nebrodensis*. Las semillas se limpiaron y se colocaron en placas de plástico con pozos cuadrados (20x20 cm; Fig. 21). Un total de 100 semillas por tratamiento fueron expuestas individualmente al análisis de rayos X, con parámetros adecuados y seleccionados (25 kV, 3 mA a una distancia de 45 cm de la fuente de rayos X durante 2 min). Se identificaron las semillas llenas (viables) y vacías (inviabiles); en las semillas llenas el embrión era bien evidente (Fig.22). Para validar esta técnica, se abrió una muestra de semillas después de que se sometieran a rayos X y se comprobó bajo el estereomicroscopio la presencia de embrión; en una semilla llena, el embrión es bien evidente con la presencia de endospermo

Para garantizar la supervivencia de las semillas después de los rayos X, se realizaron pruebas de germinación in vitro para comprobar su viabilidad y capacidad de germinación; los resultados mostraron que el 100 % sobrevivió. Esto confirmó que la exposición a los rayos X es un método no destructivo cuando se utiliza en una dosis adecuada (no letal). Basándose en esas imágenes de rayos X (Fig.23), se eliminaron las semillas vacías o infestadas por insectos o enfermedades, que se consideraron no válidas para su conservación. Esto permitió mantener y poner en marcha el banco de semillas (a -18°C) sólo con semillas llenas y germinables.



Fig. 21. 100 semillas en placas con celdas cuadradas

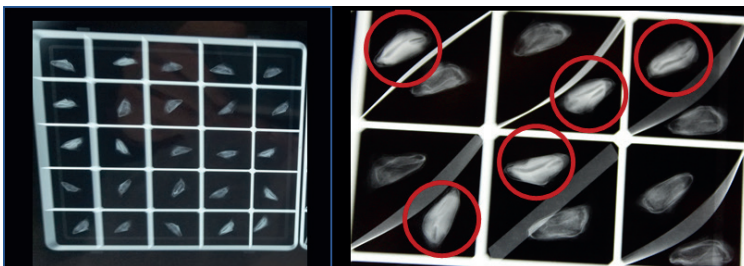


Fig. 22. Izquierda: Semillas sometidas a Rayos X (izquierda). Derecha: semillas llenas (rodeadas por círculos rojos) y semillas vacías.



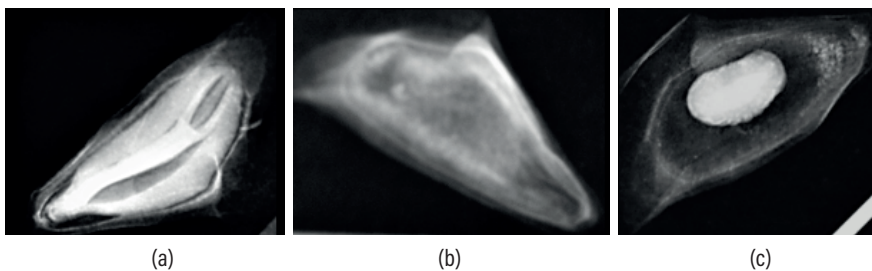


Fig. 23. Semilla llena con embrión (a); semilla vacía (b); semilla con larva (c)

### 6.2.3 Protocolo de conservación de semillas a baja temperatura (-18°C)

Los conos se recolectaron en octubre y las semillas se extrajeron y conservaron a 4°C durante un corto período de tiempo. Tras el análisis de rayos X, sólo se seleccionaron las semillas completas y sanas para su almacenamiento.

Antes de ser sembradas, las semillas seleccionadas se sometieron a una prueba de viabilidad (mediante la prueba de TTC/cloruro de trifetil tetrazolio) y se pusieron a germinar in vitro en un medio sólido (MS sin hormonas, 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar).

Dado que el contenido de humedad de las semillas es un factor crítico para determinar el éxito del almacenamiento en el banco de semillas, éste se evaluó (6-8%) mediante un analizador de humedad (Mettler-Toledo). Las semillas se pesaron y se colocaron en tarros etiquetados que contenían toda la información asociada (Fig. 24): ubicación del banco de semillas, especie, número de planta, año de recolección, cantidad (gr), número de semillas, y fecha de inicio de la conservación. Los tarros se almacenaron en la cámara de congelación (-18°C).



Figure 24. Frasco etiquetado con la información de la muestra de semillas y transferido al banco de semillas



Fig. 25. Banco de semillas de *A. nebrodensis*

#### 6.2.4 Constitución del banco de semillas de *Abies nebrodensis*

Es fundamental identificar una sala adecuada para el establecimiento del banco de semillas. Tras una inspección para comprobar la accesibilidad de los visitantes, la sala elegida se situó en el Ayuntamiento de Polizzi Generosa. La sala se limpió completamente antes de la llegada del equipo y se realizaron las intervenciones relacionadas con las normas de seguridad requeridas.

En la sala seleccionada, se ubicó la cámara de congelación (Fig. 25) para el almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$  de las semillas de *A. nebrodensis*. Esta sala tiene las siguientes especificaciones principales

- dos puertas de vidrio transparentes para inspeccionar fácilmente el contenido
- temperatura de hasta  $-20^{\circ}\text{C}$  para el almacenamiento de las semillas
- ruedas y cerradura de seguridad con llaves
- equipamiento interno: 6 estantes
- iluminación interna: con tubos de leds, con activación automática tanto en la apertura de cada puerta como mediante un botón especial en el panel de control
- panel de control: situado en la parte superior de la estructura

Dentro de la cámara de congelación ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), se colocaron frascos etiquetados con semillas completas de *A. nebrodensis*.

### 6.3 Los criobancos

#### 6.3.1 Objetivos de los criobancos

La criopreservación, es decir, el almacenamiento a temperaturas ultrabajas como la del

nitrógeno líquido (LN;  $-196^{\circ}\text{C}$ ), es el método más innovador que permite la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos. Este método preserva órganos y tejidos, tanto de cultivo in vitro como de campo, mediante un proceso de enfriamiento ultrarrápido que, si está bien desarrollado y adaptado al espécimen vegetal específico, detiene casi todos los procesos metabólicos de la célula, preservando su estructura y funcionalidad biológica. De hecho, a una temperatura criogénica permanecen activas muy pocas reacciones biológicas y variaciones significativas de las propiedades fisicoquímicas. El nitrógeno es un gas criogénico que en la fase líquida está fácilmente disponible, tiene un coste limitado y se utiliza universalmente en los criobancos, donde asegura el mantenimiento de temperaturas que van desde aproximadamente  $-150^{\circ}\text{C}$  (para las muestras almacenadas en el espacio del contenedor lleno de los vapores del gas) hasta  $-196^{\circ}\text{C}$  (para las muestras sumergidas en la fase líquida del LN). La ausencia total de subcultivos y la detención del metabolismo celular producida por las temperaturas criogénicas hacen de la criopreservación un método seguro en cuanto a la estabilidad genética del material almacenado. Prueba de ello son los numerosos trabajos experimentales que, especialmente en los últimos 30 años, han evaluado los aspectos fenotípicos, citológicos, bioquímicos y de estabilidad molecular del material sometido a conservación en LN, no mostrando nunca alteraciones estables significativas. Por lo anterior, la criopreservación representa una importante opción adicional para la conservación de los recursos genéticos de *Abies nebrodensis*, y con el tiempo se han desarrollado diversos procedimientos que permiten la conservación de un pool de órganos y tejidos provenientes de cultivo in vitro o directamente del campo. En el MAN (Museo dell'*Abies nebrodensis*) del municipio de Polizzi Generosa se ha creado un criobanco que conservará muestras de embriones extirpados, polen y callos embriogénicos, estos últimos incluidos en semillas sintéticas, del mayor número posible de los 30 árboles de *Abies nebrodensis*.

### **6.3.2 Constitución del criobanco para *Abies nebrodensis***

La sala del criobanco se ha limpiado completamente antes de la llegada del equipo y se han realizado las intervenciones relacionadas con las normas de seguridad requeridas en un ambiente que contiene nitrógeno líquido.

En cuanto a las normas de seguridad, la sala fue equipada con (i) dos detectores de oxígeno colocados en puntos diametrales de la sala, (ii) una ventana en la puerta de acceso que permite una visión completa del interior cuando la puerta está cerrada y (iii) corsé de protección, máscara y guantes (Fig. 26) para ser utilizados durante las operaciones de llenado del dewar con nitrógeno líquido y la manipulación de las muestras en el almacenamiento.

Las características más destacadas del dewar utilizado para la criopreservación de *A. nebrodensis* (Locator 8 Plus; Fig. 27) son las siguientes:

- contenedor para el almacenamiento de muestras (dewar) en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ,

equipado con un monitor de nivel ultrasónico

- capacidad de 121 litros
- bastidores unitarios 8, con una capacidad de 10 cajas por bastidor 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
- dimensiones externas diámetro x altura: 55,8 x 95,3 cm
- tapa con cierre.

Para el suministro periódico de nitrógeno líquido (cada dos meses), se ha contactado con empresas proveedoras situadas en Palermo. Para la gestión del criobanco se empleará personal con las competencias adecuadas.

La sala estará amueblada con carteles que ilustran el proyecto LIFE4FIR y las innovadoras técnicas de conservación aplicadas para conservar esta especie amenazada.



Fig. 26. Corsé (izquierda), máscara (centro) y guantes (derecha) para la protección durante las operaciones con nitrógeno líquido.



Fig. 27. Locator 8 Plus, dewar para la conservación de muestras en nitrógeno líquido para el criobanco de germoplasma de *Abies nebrodensis* (izquierda); estante y caja donde se asignan los crioviales (derecha).

### 6.3.3 Protocolos de criopreservación para *Abies nebrodensis*

#### Protocolo de criopreservación del polen

Las anteras maduras se recogieron de los árboles de *A. nebrodensis* durante el mes de mayo. Tras la extracción de las anteras, los granos de polen recogidos se tamizaron y se realizó una caracterización morfológica mediante estereomicroscopio, microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM). Esto mostró que los granos de polen de *A. nebrodensis* son isodiamétricos con un cuerpo central elíptico con dos sacos aeríferos laterales (bisacados) y un leptoma de apertura. Los sacos aeríferos sobresalen claramente del cuerpo.

El contenido de humedad del polen se midió con el instrumento Moisture Analyzer pesando 0,2 gr de polen. Para la criopreservación del polen, no fue necesario ningún proceso de desecación ya que su contenido de agua del 8-10% se alcanza después de tres días de almacenamiento a 4°C. Las muestras de polen se transfirieron a crioviales y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (-196°C).

Para validar el protocolo, los crioviales que contenían el polen se descongelaron en una cabina de flujo laminar durante 2 horas a temperatura ambiente. El polen criopreservado se sometió a pruebas de viabilidad mediante cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TTC) y de germinabilidad in vitro sobre sustrato sólido, antes y después de la criopreservación.

Para la prueba TTC, se dejaron caer dos gotas de solución TTC (1%, 200 mg de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio y 12 g de sacarosa en 20 ml de agua destilada) sobre un portaobjetos con granos de polen y se cubrió con un cubreobjetos. Tras 24-48 h de incubación en la oscuridad, se observaron al microscopio y los granos de polen teñidos de color naranja o rojo brillante se consideraron viables (Fig. 28). La germinación in vitro del polen criopreservado se ensayó en un medio semisólido compuesto por ácido bórico (50 mg/L), sacarosa (15 g/L) y agar vegetal (6 g/L) a 25°C y tras una incubación de 24-48 h se comprobó al microscopio. El grano de polen se consideró germinado cuando la longitud del tubo de polen era  $\geq 3$  veces el diámetro del grano (Fig. 29).

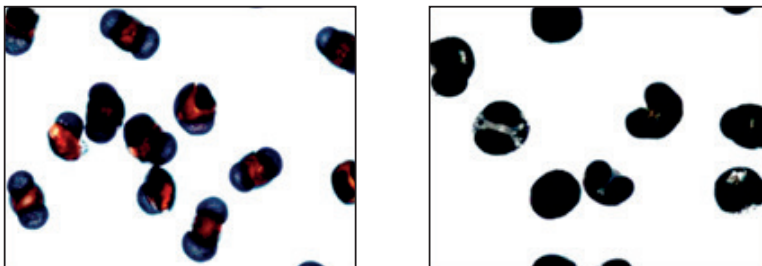


Fig. 28. TTC test -Polen viable (izquierda), inviable (derecha)

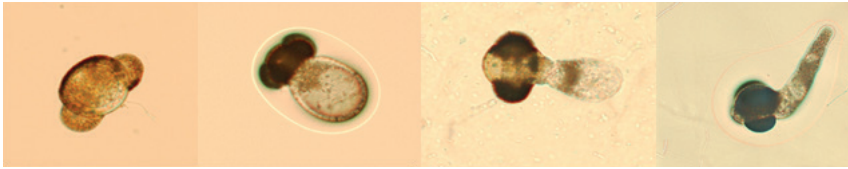


Fig. 29. Germinación In del polen en medio sólido y desarrollo del tubo polínico

### 6.3.4 Protocolo de criopreservación de embriones cigóticos

Los conos de los árboles *Abies nebrodensis* se cosecharon en octubre y se secaron en un entorno controlado. Las semillas maduras se limpiaron y se mantuvieron a 4 °C durante un breve periodo de tiempo, tras el cual se lavaron con agua del grifo, desinfectaron con etanol (70%, 1 min), hipoclorito de sodio (2%, 20 min) que contenía unas gotas de Tween 20%, y se enjuagaron en agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se embebieron en agua durante 48h en condiciones estériles y se abrieron para extraer los embriones (Fig. 30). El contenido de humedad de los embriones extirpados se determinó mediante un analizador de humedad que indicaba un nivel óptimo de humedad de <10% antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Los embriones extirpados se introdujeron en crioviales, tratados con la Solución de Vitrificación Vegetal 2 (PVS2; 30% de glicerol, 15% de etilenglicol, 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) en MS, 0,4 M de sacarosa) o no (-PVS2), y se transfirieron dentro de la criobox antes de la inmersión en nitrógeno líquido a -196°C.

Todos los crioviales, después de la descongelación en un baño de agua (1 minuto a 40 °C), se colocaron bajo el flujo laminar, se eliminó la solución PVS2 y se sustituyó por una solución de lavado (medio MS líquido con 1,2 M de sacarosa) durante 20 min.

Para validar el protocolo, se aplicaron pruebas de TTC y de germinación in vitro en embriones cigóticos criopreservados para estimar su viabilidad y germinación. Los embriones cigóticos se sumergieron completamente en TTC (0,1% p/v) durante 24 horas en la oscuridad a 30°C. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y el desarrollo del color rojo fue el principal indicador de si el embrión estaba vivo o no. La germinación in vitro se llevó a cabo cultivando los embriones criopreservados in vitro en medio Murashige y Skoog (MS) sin hormonas.

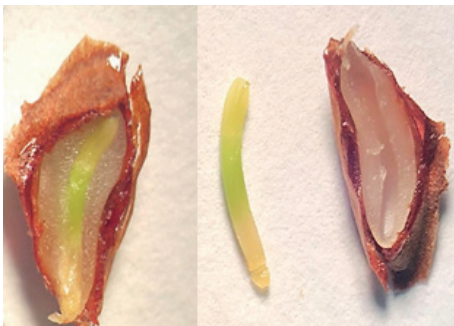


Fig. 30. Semilla madura esterilizada con embrión (izquierda), embrión extirpado (derecha)

### 6.3.5 Protocolo de criopreservación de líneas de callo embriogénico

Para *Abies nebrodensis*, las líneas de callo embriogénico se obtuvieron mediante inducción a partir de embriones maduros. Los embriones se extrajeron de semillas maduras cosechadas en octubre de 2020 de árboles adultos con el siguiente número de identificación (ID): 6, 7, 8, 10, 12, 13, 19, 21, 22, 27 y se colocaron horizontalmente en placas de Petri. Se probaron tres medios: Medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con diferentes concentraciones de auxina y citoquinina. El callo embriogénico (Fig. 31) se obtuvo, por primera vez en esta especie, sólo en el medio SH suplementado con una citoquinina (1 mg/L de BAP). Después de 8-12 semanas en el medio de iniciación en la oscuridad, el callo fue separado del embrión y transferido a un medio fresco como líneas celulares individuales para la proliferación. El medio de proliferación fue el mismo para la etapa de iniciación. El tejido embriogénico (TE) se cultivó en la oscuridad a 25 °C y se subcultivó en un medio fresco cada 15 días. Cuando se desarrolló una cantidad suficiente de TE, las líneas celulares individuales se transfirieron a un medio de maduración (SH con ácido abscísico 10 mg L<sup>-1</sup>, polietilenglicol 8% y maltosa 40%). Los cultivos se transfirieron a medios frescos cada 2 semanas y se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad. La formación de TE se observó continuamente al microscopio, junto con el desarrollo de embriones somáticos.

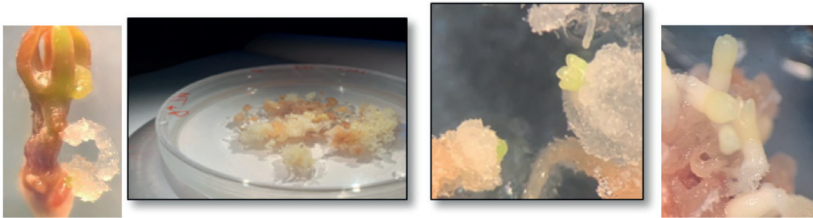


Fig. 31. Inducción y desarrollo de líneas de callo embriogénico

## CAPITULO 7

### Replamamiento en núcleo y redifusión con plántulas seleccionadas

A través de la acción C6, el proyecto LIFE4FIR tiene como objetivo la creación de núcleos de repoblación de *A. nebrodensis* mediante plántulas obtenidas de cruces controlados, criadas en el vivero "Piano Noce" de Polizzi Generosa.

Las inspecciones llevadas a cabo en el territorio del Parque de las Madonie han permitido identificar los lugares que presentan condiciones ecológicas y ambientales adecuadas, también sobre la base de las indicaciones proporcionadas por los resultados de las parcelas de repoblación de *A. nebrodensis* establecidas en los últimos años. Se han tenido especialmente en cuenta los resultados obtenidos con las parcelas experimentales creadas entre 2001 y 2005 con el proyecto LIFE2000NAT/IT/7228 "Conservación in situ y ex situ de *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei". En total, se identificaron diez lugares en la zona de Madonie, distribuidos en los municipios de Polizzi Generosa, Isnello, Petralia Soprana, Petralia Sottana, Geraci Siculo y Gratteri (Tab. 5 y Fig. 32). Todos los lugares se encuentran dentro del perímetro del Parque de las Madonie, en zonas gestionadas por el Departamento de Desarrollo Agrícola y Territorial del Gobierno Regional.

sito	Comune	latitudine	longitudine	Altitudine (m slm)
Casa Prato	Polizzi Generosa	37°50'49.79"N	14°1'58.23"E	1610
Sanguisughe (Portella Fatuzza)	Polizzi Generosa	37°48'55.52"N	14°1'53.78"E	1140
Quacella	Polizzi Generosa	37°50'51.71"N	14°0'45.07"E	1240
Piano Formaggio	Isnello	37°53'36.80"N	14°0'15.21"E	1220
Favarotta	Isnello	37°54'21.87"N	13°59'11.92"E	820
Savochella	Petralia Soprana	37°50'20.15"N	14°6'39.78"E	1450
Mandarini	Petralia Sottana	37°51'39.69"N	14°5'38.07"E	1290
Fegotti	Geraci Siculo	37°50'26.18"N	14°8'43.18"E	1270
Pantano	Geraci Siculo	37°50'24.47"N	14°9'25.03"E	1110
Serra Arcia	Gratteri	37°57'26.97"N	13°58'6.06"E	750

Tabla 5 - Localización de los diez lugares de reforestación de *A. nebrodensis* en el Parque de Madonie.





Fig. 32 Mapa con la información de la posición de las diez parcelas de reforestación en el territorio del Parque de Madonie.

## 7.1 Características de la vegetación del área seleccionada

Las diez parcelas se sitúan principalmente en zonas comprendidas entre los 1100 y 1600 m s.n.m. de altitud, caracterizadas principalmente por formaciones caducifolias mesófilas de las siguientes asociaciones clímax *Quercion ilicis*, *Quercion roboris* y *Geranium versicoloris* - Fagion. Sólo dos parcelas están situadas a menor altitud, entre 750 y 850 m s.n.m. En estas zonas, sin embargo, las condiciones microclimáticas parecen potencialmente adecuadas para el desarrollo de las plántulas de *A. nebrodensis*.

Los lugares situados entre 1100 y 1400 m de altitud forman parte de la asociación clímax del *Ilici aquifolii-Quercetum austrotyrrhenicae*, una asociación forestal relictiva de considerable interés geobotánico, establecida en las arenitas de cuarzo del *Flysch Numidiano*. Estos bosques se caracterizan por *Quercus petraea* subsp. *austrotyrrhenica* como especie principal, asociada a *Acer obtusatum*, *A. campestre* y, en menor medida, a *A. monspessulanum*, *Sorbus torminalis* y *Ulmus glabra*. En los lugares más fríos y a mayor altura, se pueden encontrar especies del cinturón superior como *Fagus sylvatica* y *Acer pseudoplatanus*. El sotobosque se compone principalmente de *Ilex aquifolium*, que encuentra aquí las condiciones óptimas de crecimiento, formando una densa capa de vegetación interrumpida únicamente por *Malus sylvestris*, *Crataegus orientalis* subsp. *orientalis*, *Prunus spinosa*, *Euonymus europaeus*, *Daphne laureola*, *Rhamnus catharticus* y *Ruscus aculeatus*. Entre las plantas herbáceas, además de la *Aquilegia vulgaris* típica de esta asociación, hay algunas especies de interés fitogeográfico como, *Anemone apennina*, *Cyclamen repandum*, *C. hederifolium*, *Dactylorhiza romana*, *Hieracium racemosum* subsp. *pignattianum*, *Drymochloa drymeia*, *Lathyrus venetus*, *Primula acaulis*, *Symphytum gussonei*, *Viola reichenbachiana*.

Las parcelas situadas por encima de los 1400 m de altitud se encuentran dentro de los bosques de hayas, relacionados con la asociación clímax *Geranium versicoloris-Fagion*. Estos bosques están dominados por *Fagus sylvatica* que a menudo se asocia con árboles envejecidos de *Acer pseudoplatanus*. El sotobosque se caracteriza por la presencia de *Sorbus graeca*, *Orthilia secunda* subsp. *secunda*, *Euphorbia meuselii* y, esporádicamente, *Rhamnus catharticus* e *Ilex aquifolium*. En los lugares más abiertos y menos favorables, se encuentran también *Astragalus nebrodensis*, *Crataegus laciniata*, *Prunus mahaleb* subsp. *cupaniana* y *Rosa sicula*. El estrato herbáceo está formado por unas pocas especies, entre las que las más frecuentes son: *Allium pendulinum*, *Anemone apennina*, *Galium odoratum*, *Cardamine chelidonia*, *Cyclamen hederifolium* subsp. *hederifolium*, *Corydalis solida*, *Doronicum orientale*, *Galium odoratum*, *Geranium versicolor*, *Lamium flexuosum* var. *pubescens*, *Luzula sylvatica* subsp. *sicula*, *Monotropa hypopitys*, *Lactuca muralis*, *Neottia nidus-avis*, *Scilla bifolia* y *Hieracium racemosum* subsp. *pignattianum*.

Algunos lugares situados entre 800 y 1200 m de altitud (Quacella, Piano Formaggio, Favarotta), aunque situados en un sustrato calcáreo, tienen un suelo profundo y descalcificado. Están afectados por rasgos vegetativos relacionados con el encinar mesófilo (*Aceri campestris-Quercetum ilicis*), una asociación caracterizada por la presencia de *Ilex aquifolium* y algunas especies de árboles caducifolios como *Acer campestre*, *A. monspessulanum*, *Sorbus greca*, *Malus sylvestris* y robles emparentados con *Quercus pubescens*. En el sotobosque, además de las especies ya citadas, se pueden encontrar muchos taxones, como *Euphorbia characias*, *Fraxinus ornus*, *Lonicera etrusca*, *Pyrus amygdaliformis*, *Rubia peregrina*, *Rosa sempervirens*, *Ruscus aculeatus*, *Clematis vitalba*, *Daphne laureola* y *Tamus communis*. El estrato herbáceo está representado por *Brachypodium sylvaticum*, *Cyclamen hederifolium*, *C. repandum*, *Lamium flexuosum*, *Asplenium onopteris*, *Thalictrum calabricum*, *Trifolium pratense*, *Viola dehnhardtii*, *Paeonia mascula* subsp. *mascula*.

Un lugar situado a unos 750 m de altitud (Serra Arcia) se justifica por la consideración de que *A. nebrodensis* crecía en el pasado en cotas más bajas en comparación con la población residual que, debido a la acción antropogénica, está ahora restringida a lugares menos accesibles situados entre 1400 y 1600 m de altitud.

## 7.2 Técnica de plantación

En cuanto a la plantación de los plantones de *A. nebrodensis* en las parcelas individuales, el procedimiento tendrá debidamente en cuenta los resultados positivos obtenidos con las plantaciones realizadas en el anterior proyecto LIFE.

La plantación se realizará siguiendo las curvas de nivel y la exposición del lugar. Teniendo en cuenta los objetivos del proyecto Life4fir, las parcelas individuales, tendrán una superficie de entre 3000 y 4000 m<sup>2</sup> y el número de plantas que se plantarán será de 400. El espaciamiento debe permitir que las plantas crezcan sin perturbaciones y se definirá para evitar daños a

cualquier especie rara y/o endémica presente.

Para cada una de las parcelas, se aplicarán las siguientes medidas de forma escalonada: vallado, apertura de los huecos, plantación de arbustos leguminosos mejoradores, plantación de plántulas de *A. nebrodensis*.

### 7.3 Vallado

Las vallas se instalarán a lo largo del perímetro de cada parcela siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las vallas de protección instaladas alrededor de los árboles relictos de la población natural. Se utilizarán postes de castaño con un diámetro de 8-10 cm y una longitud de 2,40 m. Se introducirán en el suelo unos 40 cm y se colocarán a una distancia de 2 m entre sí (Fig. 33). Su altura sobre el suelo será de unos 2 m. La entrada a las parcelas se permitirá mediante puertas de 1,5 m de ancho y 1,80 m de alto (Fig. 34).



Fig 33. Colocación de la puerta



Fig. 34. Vallado

### 7.4 Cavar los agujeros para la plantación

La apertura de los hoyos se realizará en el suelo tanto con dispositivos mecánicos como con equipos agrícolas específicos. Los agujeros, separados entre sí unos 3-4 metros, no tendrán un patrón de espaciado bien definido, sino que se excavarán en función de las características del lugar. Para garantizar a las jóvenes plántulas de *A. nebrodensis* un desarrollo armonioso del sistema radicular y una mayor reserva de agua, los hoyos tendrán una forma particular. Se preferirán los agujeros troncocónicos y los agujeros piramidales.

Los primeros tendrán un diámetro inferior de unos 80 cm y un diámetro superior de unos 90 cm, con una profundidad de entre 50 y 60 cm (Fig. 35). Los agujeros piramidales tendrán el lado inferior de 80 cm, el superior de 50 cm, mientras que la profundidad será de 60 cm (Fig. 35).

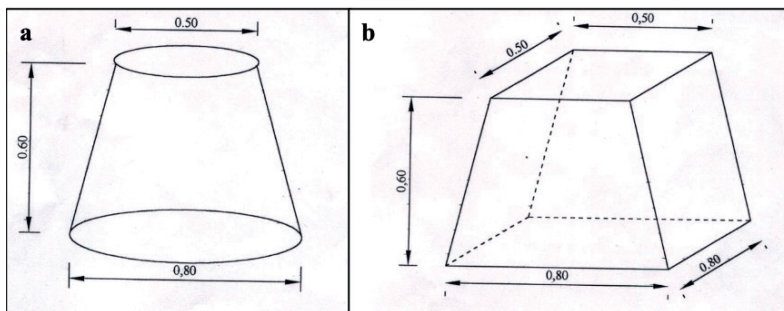


Fig. 35. Esquema de un agujero en forma de cono truncado (a) y de un agujero en forma de pirámide truncada (b).

## 7.5 Plantación de leguminosas mejoradoras

La plantación de arbustos pertenecientes a la familia de las fabáceas tiene por objeto mejorar la fertilidad del suelo y garantizar una protección adecuada de las plántulas de *A. nebrodensis* contra el exceso de luz solar, el calor y la sequía estival tras el trasplante en el campo.

Los arbustos que se utilizarán pertenecen a los géneros *Genista*, *Spartium* y *Cytisus* y tendrán 2-3 años de edad. Se plantarán cerca de las plántulas de *A. nebrodensis* a una distancia de unos 50 cm, lo que ayudará a mantener un microclima adecuado para el desarrollo de las plántulas en el periodo de primavera-verano y a protegerlas de los fuertes vientos. Por lo general, se plantarán dos arbustos alrededor de cada plántula de *A. nebrodensis*.

## 7.6 Plantación de plántulas de *A. nebrodensis*

Para cada parcela individual, se plantarán 400 plántulas criadas en contenedores de 9x9x20 cm en el vivero. Las plántulas tendrán unos 3 años de edad. En el vivero, se trasplantaron después de 1 año y se sometieron a micorrización. La plantación, como ya se ha dicho, no seguirá un patrón geométrico, sino que se realizará en función de la morfología del suelo y de acuerdo con la vegetación asentada. Durante la plantación, se añadirá al hoyo un abono orgánico rico en fósforo para ayudar a las plántulas trasplantadas. Tras la plantación, se creará una hondonada en el suelo alrededor de cada planta para favorecer la acumulación de agua. Además, para reducir la evaporación del suelo alrededor del hoyo, en primavera se realizará un acolchado con material vegetal obtenido de las especies herbáceas presentes en las inmediaciones de las parcelas.

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



## AUTORES

Filippo Amato

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

Gianniantonio Domina

Giovanni Emiliani

Arcangela Frascella

Anna Geraci

Maria Antonietta Germanà

Tolga Izzù

Francisco J. Jimenez Lopez

Nourhene Jouini

Maurizio Lambardi

Gaetano La Placa

Vincenzo Lo Meo

Angelo Merlino

Angelo Messina

Giuseppe Messina

Giulia Mirabile

Elisabetta Oddo

Pedro Luis Ortiz

Biagio Sabatino

Rosario Schicchi

Stefano Secci

Antonino Taravella

Waed Tarraf

Anass Terrab

## BIBLIOGRAFÍA

Apostol, E. N., Șofletea, N., & Curtu, A. L. (2019). Ex Situ Conservation of Forest Genetic Resources in Romania. In *Forests of Southeast Europe Under a Changing Climate* (pp. 283-289). Springer, Cham.

Balao, F., Lorenzo, M. T., Sánchez-Robles, J. M., Paun, O., García-Castaño, J. L., & Terrab, A. (2020). Early diversification and permeable species boundaries in the Mediterranean firs. *Annals of Botany*, 125(3), 495-507. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz186>.

Caudullo, G., & Tinner, W. (2016). *Abies–Circum-Mediterranean firs in Europe: distribution, habitat, usage and threats*; pp 50-51.

Conte, L.; Cotti, C.; Schicchi, R.; Raimondo, F. M.; Cristofolini, G. (2004). Detection of Ephemeral Genetic Sub-Structure in the Narrow Endemic *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei (Pinaceae) Using RAPD Markers. *Plant Biosystems*, 138 (3), 279–289.

Conte, L.; Cristofolini, G. (2003). Assessment of RAPD Variation in *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei (Pinaceae) Using Haploid Tissue Analysis. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 199–206.

Conti, F.; Manzi, A.; Pedrotti, F. (1997). *Liste Rosse Regionali Delle Piante d'Italia (Regional Red List of Vascular Plants of the Italy)* [in Italianisch]. WWF Italia, Soc. Bot. Ital. Univ. Camerino.

Dakhil, M. A., Halmy, M. W. A., Liao, Z., Pandey, B., Zhang, L., Pan, K., ... & El-Barougy, R. F. (2021). Potential risks to endemic conifer montane forests under climate change: integrative approach for conservation prioritization in southwestern China. *Landscape Ecology*, 36(11), 3137-3151.

Ducci, F.; Proietti, R.; Favre, J.-M. (1999). Allozyme Assessment of Genetic Diversity within the Relic Sicilian Fir *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei. *Annals of Forest Science*, 56 (4), 345–355.

Engelmann, F. (2000). Importance of Cryopreservation for the Conservation of Plant Genetic Resources. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm—Current Research Progress and Applications*, IPGRI, Rome & JIRCAS, Tsukuba, 8–20.

Frankel, O. H.; Brown, A. H.; Burdon, J. J. (1995). *The Conservation of Plant Biodiversity*; Cambridge University Press.

Frascella, A., Della Rocca, G., Barberini, S., Emiliani, G., Secci, S., Lambardi, M., ... & Danti, R. (2022). Innovative In Situ and Ex Situ Conservation Strategies of the Madonie Fir *Abies nebrodensis*. *Sustainability*, 14(19), 12643.

Ghimire, S. R.; Richardson, P. A.; Kong, P.; Hu, J.; Lea-Cox, J. D.; Ross, D. S.; Moorman, G. W.; Hong, C. (2011). Distribution and Diversity of Phytophthora Species in Nursery Irrigation Reservoir Adopting Water Recycling System during Winter Months. *Journal of Phytopathology*, 159 (11-12), 713–719.

Giacomini, V.; Fenaroli, L.; Ferlan, L. (1958) *Conosci l'Italia: Volume II: La Flora*; Touring Club Italiano.

Häggman, H. M.; Aronen, T. S.; Rynänen, L. A. (2000). Cryopreservation of Embryogenic Cultures of Conifers. In *Somatic embryogenesis in woody plants*; Springer; pp 707–728.

Jung, T.; Orlikowski, L.; Henricot, B.; Abad-Campos, P.; Aday, A. G.; Aguin Casal, O.; Bakonyi, J.; Cacciola, S. O.; Cech, T.; Chavarriga, D. (2016). Widespread Phytophthora Infestations in European Nurseries Put Forest, Semi-natural and Horticultural Ecosystems at High Risk of Phytophthora Diseases. *Forest Pathology*, 46 (2), 134–163.

Korhonen, K.; Stahl, G. (2020). Criterion 1: Maintenance and Appropriate Enhancement of Forest Resources and Their Contribution to Global Carbon Cycles. In *FOREST EUROPE: State of Europe's Forests 2020*.

Litkowiec, M.; Sękiewicz, K.; Romo, A.; Ok, T.; Dagher-Kharrat, M. B.; Jasińska, A. K.; Sobierajska, K.; Boratyńska, K.; Boratyński, A. (2021). Biogeography and Relationships of the *Abies* Taxa from the Mediterranean and Central Europe Regions as Revealed by Nuclear DNA Markers and Needle Structural Characters. *Forest Ecology and Management*, 479, 118606.

MacDonald, J.; Ali-Shtayeh, M.; Kabashima, J.; Stites, J. (1994). Occurrence of Phytophthora Species in Recirculated Nursery Irrigation Effluents. *Plant Disease*, 78 (6), 607–611.

Morandini, R. (1969). *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei: Inventario 1968: Pubblicazione Dedicata All'annata 1970 per La Conservazione Della Natura e Delle Sue Risorse Indetta Dal Consiglio d'Europa; Istituto sperimentale per la selvicoltura.

Mosse, B., Stribley, D. P., & LeTacon, F. (1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In *Advances in microbial ecology* (pp. 137-210). Springer, Boston, MA.



- Norphanphoun, C., Doilom, M., Daranagama, D. A., Phookamsak, R., Wen, T. C., Bulgakov, T. S., & Hyde, K. D. (2017). Revisiting the genus *Cytospora* and allied species. *Mycosphere*, 8(1), 51-97.
- Parducci, L. (2000). Genetics and Evolution of the Mediterranean *Abies* Species. SLU University library, Stockholm, Sweden.
- Parducci, L.; Szmidt, A. E.; Madaghiele, A.; Anzidei, M.; Vendramin, G. G. (2001). Genetic Variation at Chloroplast Microsatellites (CpSSRs) in *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei and Three Neighboring *Abies* Species. *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (5), 733-740.
- Parducci, L.; Szmidt, A. E.; Ribeiro, M. M.; Drouzas, A. D. (2001). Taxonomic Position and Origin of the Endemic Sicilian Fir *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei Based on Allozyme Analysis. *Forest Genetics*, 8 (2), 119-128.
- Raimondo, F. M.; Schicchi, R. (2005). Rendiconto Sul Progetto LIFE Natura "Conservazione in Situ Ed Ex Situ Di *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei."
- Safina, G. F.; Nikolayeva, M. A. (2014). Prospects for cryopreservation of seeds used to store the genetic resources of conifer plants. *Biosphere*, 6 (4).
- Schicchi, R.; Amato, F.; La Placa, G.; Bonomo, G. (2014). Population Trend in *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei. In 109 Congresso Società Botanica Italiana.
- Schicchi, R.; Bazan, G.; Raimondo, F. M. (1997). La Progenie Di *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei Accertata in Vivaio. *Quad Bot Ambient Appl*, 8, 3-9.
- Schicchi, R.; Geraci, A.; Rosselli, S.; Spinella, A.; Maggio, A.; Bruno, M. (2020). Phytochemical Investigation of the Needles of *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei. *Natural Product Research*, 34 (15), 2131-2136.
- Schemske, D. W., Husband, B. C., Ruckelshaus, M. H., Goodwillie, C., Parker, I. M., & Bishop, J. G. (1994). Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, 75(3), 585-606.
- Serra-Varela, M. J., Alía, R., Daniels, R. R., Zimmermann, N. E., Gonzalo-Jiménez, J., & Grivet, D. (2017). Assessing vulnerability of two Mediterranean conifers to support genetic conservation management in the face of climate change. *Diversity and Distributions*, 23(5), 507-516.

Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., & Asiegbu, F. O. (2019). Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*, 10(1), 42.

Tong, Y., Durka, W., Zhou, W., Zhou, L., Yu, D., & Dai, L. (2020). Ex situ conservation of *Pinus koraiensis* can preserve genetic diversity but homogenizes population structure. *Forest Ecology and Management*, 465, 117820.

Towill, L. E. (2002) Cryopreservation of Plant Germplasm: Introduction and Some Observations. In *Cryopreservation of plant germplasm II*; Springer, pp 3–21.

Vendramin, G. G.; Michelozzi, M.; Lelli, L.; Tognetti, R. (1995). Genetic Variation in *Abies Nebrodensis*: A Case Study for a Highly Endangered Species. *Forest Genetics*, 2 (3), 171–175.

Venturella, G.; Mazzola, P.; Raimondo, F. M. (1997). Strategies for the Conservation and Restoration of the Relict Population of *Abies Nebrodensis* (Lojac.) Mattei. *Boccone*, 7, 417–425.

Vicario, F.; Vendramin, G. G.; Rossi, P.; Lio, P.; Giannini, R. (1995). Allozyme, Chloroplast DNA and RAPD Markers for Determining Genetic Relationships between *Abies Alba* and the Relic Population of *Abies Nebrodensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (7), 1012–1018.

Whiteley, S. E.; Bunn, E.; Menon, A.; Mancera, R. L.; Turner, S. R. (2016). Ex Situ Conservation of the Endangered Species *Androcalva Perlaria* (Malvaceae) by Micropropagation and Cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125 (2), 341–352.

Yakabe, L. E.; Blomquist, C. L.; Thomas, S. L.; MacDonald, L. D. (2009). Identification and Frequency of *Phytophthora* Species Associated with Foliar Diseases in California Ornamental Nurseries. *Plant Disease*, 93 (9), 883–890.





## BENEFICIARIOS DE LIFE4FIR

