



**MANUALE DI BUONE PRATICHE PER LA
CONSERVAZIONE IN SITU ED EX SITU DELLE SPECIE
DI ABIES MEDITERRANEE MINACCIATE**



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



INDICE

Prologo	5
Cap. 1 - Valutazione della diversità genetica e della struttura della popolazione residuale di <i>Abies nebrodensis</i>	7
1.1 Valutazione della diversità genetica di <i>Abies nebrodensis</i>	7
1.2 Genotipizzazione SNPs	9
1.3 Test di paternità	10
1.4 Conclusioni	11
Cap. 2 - Incremento della variabilità genetica della progenie attraverso l'esecuzione di incroci controllati	12
2.1 Esecuzione di incroci controllati in <i>A. nebrodensis</i>	13
Cap. 3 - Produzione di piante selezionate in vivaio	18
3.1 Valutazione della germinazione e del tasso di sopravvivenza dopo il trapianto	18
3.2 Insorgenza e frequenza dei disturbi	22
3.3 Campionamenti per isolamenti fungini	22
3.4 Valutazione della presenza di agenti patogeni del suolo	22
3.5 Misure di ecofisiologia	23
3.6 Micorrizzazione	24
Cap. 4 - Indagine fitosanitaria sugli alberi di <i>Abies nebrodensis</i> e controllo degli stress biotici e abiotici	27
4.1 Monitoraggio degli alberi di <i>A. nebrodensis</i> all'interno di LIFE4FIR	27
4.2 Ispezioni e campionamenti degli alberi	29
4.3 Indagini sul microbioma fungino	30
4.4 Indagini UAV e analisi multispettrale	30
Cap. 5 - Sostegno alla rinnovazione naturale di <i>Abies nebrodensis</i>	34
5.1 La rinnovazione naturale di <i>Abies nebrodensis</i>	34
5.2 Censimento e mappatura delle piante giovani della rinnovazione naturale	36
5.3 Consistenza e localizzazione della rinnovazione naturale	37
5.4 Il nuovo sistema di recinzioni	38
5.5 Misure per la gestione della rinnovazione naturale	40
Cap. 6 - Conservazione ex situ del germoplasma di <i>A. nebrodensis</i>	41
6.1 Creazione dell'arboreto clonale	41
6.2 Banca del seme	42
6.3 Criobanca	45
Cap. 7 - Ripopolamento in nuclei di re-diffusione con piantine selezionate	51
7.1 Caratteristiche della vegetazione delle aree selezionate	52
7.2 Tecniche di piantumazione	53
7.3 Recinzione	54
7.4 Apertura delle buche	54
7.5 Piantagione di leguminose arbustive	55
7.6 Piantagione e semina di <i>A. nebrodensis</i>	55





PROLOGO

Gli ecosistemi naturali sono fonte di beni, risorse e servizi a favore del genere umano, come: cibo, aria pulita, acqua pura, energia e materie prime, benefici sanitari, ricreativi e sociali. La biodiversità degli ecosistemi in equilibrio favorisce questa multifunzionalità e la capacità di rispondere agli impatti dei cambiamenti climatici. Tuttavia, nell'epoca moderna gli ecosistemi naturali sono minacciati dal cambiamento climatico, dalla perdita e la frammentazione degli habitat, dall'inquinamento, dall'introduzione di specie aliene, conseguenze dell'eccessiva pressione antropica sull'ambiente.

I progetti del programma LIFE sono strumenti di implementazione della politica ambientale della UE. In particolare, il sottoprogramma Natura e Biodiversità dal 1992 finanzia progetti di buone pratiche, pilota e dimostrativi per la conservazione della natura, nei settori della biodiversità, degli habitat e delle specie. Il progetto Life4fir (LIFE18 Nat/It/000164) "Strategie innovative di conservazione in situ ed ex situ dell'Abete delle Madonie (*Abies nebrodensis*) in Sicilia", fa parte di questo sottoprogramma.

L'Abete delle Madonie è l'endemismo più rappresentativo e conosciuto della Sicilia. Per la sua condizione di specie in grave rischio di estinzione, riconosciuta dalla IUCN, questa specie svolge un ruolo simbolico, e rappresenta a pieno titolo gli effetti delle modificazioni dell'habitat e della perdita di biodiversità causate dal sovrasfruttamento delle risorse naturali. Per l'Abete delle Madonie il declino ha avuto inizio dal 1800, quando questa specie era riportata come ampiamente diffusa sulle montagne della parte settentrionale della Sicilia. L'utilizzazione massiccia per l'ottenimento di pregiato legname da costruzione e il pascolamento incontrollato hanno drasticamente ridotto la popolazione di questa specie, fino ad arrivare alle 30 piante relitte che si contano oggi.

Negli ultimi due decenni, una serie di progetti ha avuto come obiettivo la salvaguardia di questa specie e la conservazione della biodiversità nel territorio del Parco delle Madonie. Tra questi, un precedente progetto LIFE2000NAT/IT/7228 e un Progetto APQ (CIPE 2004). Il progetto LIFE4FIR ha ripreso i risultati e le conoscenze delle esperienze progettuali precedenti per implementare una strategia completa, multidisciplinare e integrata, basata sull'impiego di tecniche innovative, per rispondere ai principali fattori di vulnerabilità di *Abies nebrodensis* e migliorarne lo stato di conservazione. Il lavoro congiunto delle istituzioni coinvolte (l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante e l'Istituto per la BioEconomia del CNR; UNIPA-SAAF; l'Ente Parco delle Madonie; Departamento de Biología Vegetal y Ecología dell'Università di Siviglia e il Dipartimento per lo Sviluppo Rurale e Territoriale delle Regione Sicilia) ha permesso di compiere progressi incoraggianti nell'ambito delle cinque misure fondamentali del progetto:

1. protezione e sostegno in situ agli alberi residui di *Abies nebrodensis* nel loro habitat naturale;
2. mantenimento della purezza genetica della popolazione e incremento della biodiversità nelle progenie;
3. produzione in vivaio e selezione di piantine pure, esoincrociate e vigorose;
4. interventi di reimpianto in aree idonee del Parco delle Madonie, per favorire la ridiffusione della specie;
5. conservazione ex situ con metodi tradizionali e biotecnologici attraverso l'implementazione di una banca del seme e di una criobanca.

Questo pool di azioni sinergiche costituisce un modello di procedure messo a punto per la conservazione a lungo termine di questa specie, che potrebbe essere efficacemente replicato. Il presente manuale illustra le linee guida efficaci e sostenibili che stanno producendo buoni risultati su *Abies nebrodensis* e che riteniamo possano rappresentare un utile riferimento per coloro che sono impegnati nella salvaguardia della biodiversità di conifere minacciate e a rischio di estinzione in ambito Mediterraneo.

CAPITOLO 1

Valutazione della diversità genetica e della struttura della popolazione residuale di *Abies nebrodensis*

La biodiversità di una popolazione costituisce la base della stabilità, della funzionalità e della produttività degli ecosistemi, oltre a rappresentare una fonte di servizi ecosistemici. La capacità di evolversi e adattarsi degli individui o di una popolazione di fronte a nuove condizioni climatiche o a fonti di stress (biotici e abiotici) dipende dalla loro diversità genetica. Più questa è elevata e maggiore sarà la loro possibilità di persistenza e adattamento. Questo è particolarmente vero quando si parla di diversità genetica relativa ai geni coinvolti nella risposta agli stress ambientali. Riassumendo, la diversità genetica fornisce le basi per la conservazione delle risorse genetiche inter ed intra-specie ed il suo mantenimento è fondamentale per la sopravvivenza di individui, popolazioni e specie nell'ottica di una gestione ecosistemica funzionale.

Poiché gli alberi sono normalmente le specie chiave all'interno degli ecosistemi forestali, la loro diversità genetica è molto importante ed è alla base della sostenibilità forestale. Le pratiche di rinnovamento forestale e le perturbazioni naturali possono risultare dannose per la demografia di una popolazione forestale e sui suoi processi evolutivi, portando a deriva genetica e autofecondazione e influenzando i processi di flusso genico e di selezione. Una minore densità all'interno di una popolazione forestale può anche tradursi in fenomeni quali, frammentazione, collo di bottiglia genetico, e struttura genetica spaziale, influenzando negativamente la diversità genetica e la differenziazione nelle popolazioni.

1.1 Valutazione della diversità genetica di *Abies nebrodensis*

Nel corso degli anni l'habitat di *A. nebrodensis* è diventato sempre più frammentato a causa del suo eccessivo sfruttamento che ha portato alla perdita di risorse genetiche e ad una popolazione costituita da un basso numero di individui. Attualmente, la popolazione è ridotta, frammentata, dispersa, con conseguente aumento delle probabilità di autofecondazione e deriva genetica (Fig. 1).

Inoltre, la produzione irregolare negli anni, le difficoltà di affermazione della rinnovazione, e la mancanza di un meccanismo specifico per la dispersione del seme sulle lunghe distanze sono risultate in una scarsa rigenerazione della popolazione. Per tutti questi motivi, la conservazione della specie è molto importante.

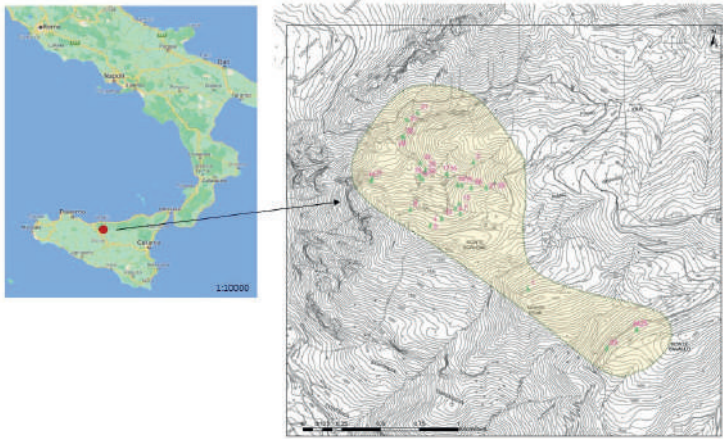


Fig. 1. Localizzazione del Parco delle Madonie in Sicilia (sinistra) e mappa della popolazione naturale di *A. nebrodensis* (destra). La posizione di ognuna delle 30 piante è riportata in scala 1:10000.



Fig. 2. Distribuzione frammentata di *A. nebrodensis* nel suo habitat naturale

La conservazione delle risorse genetiche ed i programmi di incrocio richiedono una valutazione della diversità genetica e della struttura della popolazione della specie a rischio. Una delle azioni portanti del progetto LIFE4FIR è la valutazione della variabilità genetica e delle relazioni genetiche esistenti tra gli alberi adulti e le piantine della rinnovazione naturale della popolazione di *A. nebrodensis*. Il genotipo di ogni pianta e la diversità genetica della popolazione naturale sono stati determinati attraverso la genotipizzazione tramite SNPs. Sui semenzali è stato condotto un test di paternità per determinare il grado di endogamia (incrocio tra individui imparentati) e autofecondazione e per valutare il grado

di introgressione (eventuale ibridazione) dovuto alla fecondazione dei coni femminili con polline proveniente da specie di abete non native (*Abies alba* e *Abies cephalonica*) presenti in piantagioni realizzate nelle vicinanze (Fig. 2).

1.2 Genotipizzazione SNPs

Nel corso del progetto LIFE4FIR la genotipizzazione SNPs è stata condotta attraverso la tecnologia OpenArrays (ThermoFisher Inc., Stati Uniti). Questa tecnologia costituisce una piattaforma robusta e flessibile consentendo di ottenere dati di ottima qualità con un'elevata produttività del campione a basso costo, rendendola ideale per studi che coinvolgono grandi volumi di campioni.

L'adozione di questo approccio è molto utile per la genotipizzazione di una popolazione e l'osservazione delle mutazioni che si presentano all'interno del genoma. L'Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà di Piante raccomanda gli SNP e i microsatelliti come marcatori preferiti per la tipizzazione del DNA e la caratterizzazione varietale. Un singolo polimorfismo nucleotidico (SNP) è una variazione del materiale genetico su un singolo nucleotide presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%. Queste differenze a livello nucleotidico permettono di distinguere fra le varietà e gli ecotipi, o persino gli individui all'interno della stessa specie. Attraverso la genotipizzazione SNPs si ottengono milioni di sequenze geniche in breve tempo e a basso costo. I dati prodotti dal sequenziamento, confrontati con le informazioni presenti nelle banche dati pubbliche relative ai genomi delle specie già sequenziate (riferimento), portano all'identificazione delle differenze nucleotidiche. Questo genera un profilo genetico molto dettagliato, caratterizzato da migliaia di SNPs ognuno dei quali è ben identificato per la sua posizione nel genoma della specie in analisi (Fig. 3).

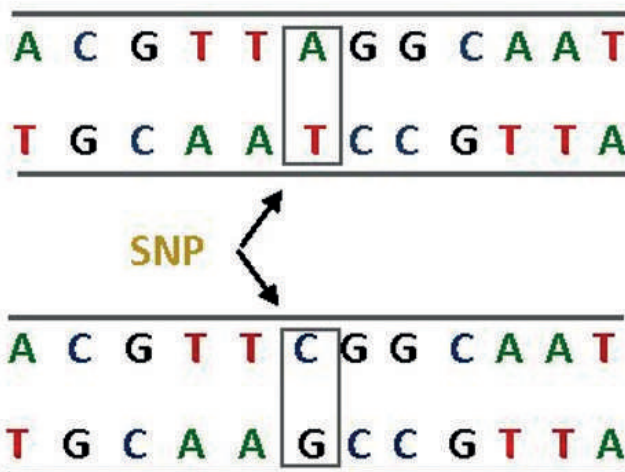


Fig. 3. Rappresentazione schematica di Polimorfismo del Singolo Nucleotide

1.3 Test di paternità

Il test di paternità viene condotto per determinare il legame biologico tra la progenie e un presunto padre, al fine di generare una probabilità di paternità. Sulla base dei risultati di somiglianza genetica ottenuti dalla genotipizzazione SNP, un software specifico deduce l'origine di ogni individuo, assegnando i loro presunti genitori, per determinare il tasso di endogamia e autofecondazione e per valutare l'eventuale ibridazione dovuta al polline proveniente da specie non native del genere *Abies*. La presenza di un alto tasso di endogamia o autofecondazione è spesso accompagnata da un impoverimento genetico (omozigosi) che porta ad una popolazione più suscettibile agli stress biotici e abiotici. Il test di paternità permette di determinare i migliori incroci per un miglioramento genetico della specie aumentando la percentuale di eterozigosi.

Risultati ottenuti sulla popolazione di *A. nebrodensis*

1. I risultati accurati e affidabili ottenuti tramite gli OpenArray utilizzando 100 SNPs indicano chiaramente che la maggior parte degli alberi adulti sono geneticamente vicini. La dimensione effettiva della popolazione, un parametro chiave nella genetica di popolazione per stimare il numero di individui che contribuiscono efficacemente alla generazione di progenie successiva, è molto bassa. Questi risultati sono in contrasto con i risultati di studi precedenti basati su altri marcatori molecolari, che hanno mostrato alti tassi di diversità genetica nella popolazione naturale di *A. nebrodensis*.
2. Il test di paternità ha dimostrato che oltre il 90% delle piantine della rinnovazione naturale derivano da autofecondazione. Questo implica che, la deriva genetica, l'endogamia e l'alto tasso di omozigosi vanno a ridurre la capacità delle piantine di far fronte a un'ampia varietà di fattori di stress ambientale, il che probabilmente spiegherebbe il basso tasso di sopravvivenza delle piantine riportato in studi precedenti.
3. Allo stesso modo, in vivaio, la progenie pura di *A. nebrodensis* ottenuta da libera impollinazione ha mostrato alti tassi di autofecondazione (più del 95%). È stata inoltre riscontrata la presenza significativa di ibridi provenienti da incroci con altri abeti.
4. Per incrementare la variabilità genetica della popolazione, è stato programmato un piano di incroci controllati tra individui geneticamente distanti di *A. nebrodensis*. Un elenco dei 30 incroci più raccomandati tra gli alberi maturi di *A. nebrodensis* è stato stilato in base ai risultati delle analisi genetiche condotte.

1.4 Conclusioni

I risultati sull'uniformità genetica della popolazione e l'alto tasso di autofecondazione riscontrato sulla rinnovazione naturale erano in gran parte attesi, e il ricorso agli incroci controllati tra le piante era già stato pianificato. I risultati delle analisi genetiche effettuate sono stati di grande aiuto per pianificare i prossimi incroci controllati definendo le combinazioni tra piante con maggiore distanza genetica al fine di aumentare la variabilità della progenie. L'identificazione di ibridi tra le progenie derivante da impollinazione libera e allevata nel vivaio locale è stata invece meno attesa. Questo risultato va considerato con grande cautela per la futura gestione della popolazione e sarà di impatto sulle altre azioni del progetto.

CAPITOLO 2

Incremento della variabilità genetica della progenie attraverso l'esecuzione di incroci controllati

Il problema principale nella conservazione delle specie a rischio di estinzione è l'aver subito una graduale o improvvisa diminuzione del numero di individui. La struttura genetica della popolazione può avere importanti conseguenze sulla vitalità a lungo termine della specie e dovrebbe pertanto essere fonte di preoccupazione per coloro i quali si occupano della sua conservazione. Una delle conseguenze negative riscontrate in popolazioni di piccole dimensioni è l'aumento della frequenza di consanguineità, che può portare alla perdita immediata di forma fisica (i.e. diminuzione della sopravvivenza o del successo riproduttivo, definita 'depressione di consanguineità'). Una seconda conseguenza è la perdita di variazione genetica, che può tradursi in una ridotta capacità di adattamento delle popolazioni alle nuove sfide proposte dal loro ambiente, quali malattie infettive o il cambiamento climatico. Nonostante l'eliminazione dell'agente causale del declino dovrebbe sempre essere prioritario, sia l'endogamia che la perdita di variazione genetica possono portare all'aumento del rischio di estinzione.

Una conseguenza potenzialmente negativa della frammentazione dell'habitat è il limitato flusso genico tra le piccole popolazioni rimanenti che può portare all'esaurimento genetico e alla ridotta idoneità individuale (Charlesworth & Charlesworth 1999; Leimu et al. 2010; Angeloni et al. 2011). Anche piccole popolazioni sono colpite dalla deriva genetica che può causare la fissazione di alleli recessivi deleteri che portano alla perdita della diversità genetica della popolazione e a un'ulteriore riduzione della forma fisica. Un ampio gruppo di ricerche empiriche ha dimostrato l'esistenza di una relazione tra la riduzione della diversità genetica, l'elevato tasso di endogamia e la ridotta idoneità nelle popolazioni di piante selvatiche (rivisto da Leimu et al. 2006 e negli alberi tropicali in particolare da Lowe et al. 2005).

Integrando popolazioni geneticamente impoverite con nuovi individui (o genotipi) è possibile alleviare l'erosione genetica (Thrall et al. 1998) e migliorare la vitalità della popolazione (Tallmon et al. 2004; Pimm et al. 2006) attuando un salvataggio genetico. Studi sulle piante annuali e perenni hanno dimostrato che il flusso genico tra le popolazioni mediato dal polline e l'introduzione di nuovi individui possono aumentare la vitalità della popolazione, un effetto che appare più pronunciato nelle piccole popolazioni. L'impollinazione controllata permette l'incrocio tra piante isolate e favorisce la creazione di nuovo patrimonio genetico. Gli incroci dovrebbero prendere in considerazione fattori come l'incremento della fitness riproduttiva in termini di allegagione, numero di semi, tasso di germinazione e sopravvivenza delle piantine poiché l'impollinazione libera porta principalmente all'autofecondazione.

2.1 Esecuzione di incroci controllati in *A. nebrodensis*

Nell' Aprile 2020, gli alberi adulti *A. nebrodensis* sono stati monitorati porgendo particolare attenzione all'apertura delle gemme, allo sviluppo delle strutture riproduttive e alla piena fioritura. Nel 2020 la fioritura di *A. nebrodensis* è avvenuta all'inizio di Maggio ed è stata molto abbondante, a differenza dell'anno precedente. Tutti i 25 alberi maturi della popolazione naturale hanno prodotto coni maschili e femminili, alcuni in grande quantità. L'impollinazione incrociata manuale tra gli alberi è stata eseguita da tecnici specializzati che lavorano per Unipa.

Coni maschili maturi (e prossimi alla fioritura) (Fig. 4a) sono stati raccolti separatamente dai singoli alberi del popolamento e conservati in sacchetti di carta fino al loro utilizzo sui coni femminili (Fig. 4b). Questi sono stati isolati da polline esterno prima della loro apertura utilizzando dei sacchetti in terilene, un materiale speciale idrofobo, ma che allo stesso tempo consente la traspirazione (Fig. 4c). Al momento dell'apertura dei coni, all'interno dei sacchetti sono stati inseriti dei coni maschili maturi in base alla combinazione d'incrocio. Il naturale movimento del sacchetto dovuto al vento favorisce la dispersione del polline dai coni all'interno del sacchetto permettendo l'impollinazione dei coni femminili.



Fig. 4. Coni maschili e femminili (a e b) di *A. nebrodensis*. c) Sacchetti di terylene utilizzati per l'isolamento dei coni femminili ed eseguire gli incroci controllati nelle piante madre 16 e 17.

Un totale di 174 sacchetti sono stati utilizzati su 24 alberi proteggendo 488 coni femminili dal polline esterno. I coni maschili maturi provenienti da alberi selezionati sono stati poi inseriti nei sacchetti e gli incroci sono stati eseguiti secondo 27 diverse combinazioni parentali, basati sulla distanza geografica tra le piante. Lo sviluppo di coni all'interno dei sacchetti è stato monitorato durante l'estate a intervalli di 15 giorni. La maturazione dei coni è avvenuta regolarmente e i sacchetti sono stati rimossi alla fine di Settembre per raccogliere i coni prima della loro disarticolazione ed estrarre i semi in Ottobre (Fig. 4d).



Fig. 4d. Coni maturi di *A. nebrodensis*

I semi sono stati estratti separatamente dai coni e seminati nel vivaio forestale di Piano Noce a partire da Dicembre.

Poiché nel 2021 la fioritura non si è verificata affatto nella popolazione di *A. nebrodensis*, le impollinazioni manuali non sono state eseguite. Nel maggio 2022 la fioritura è stata buona (non abbondante come nel 2020) consentendo l'attuazione di altri incroci controllati. Questa volta, le combinazioni parentali sono state basate sulla distanza genetica tra le piante, utilizzando i dati ottenuti dalla genotipizzazione SNPs. Complessivamente sono state eseguite 23 combinazioni di incrocio, utilizzando 121 sacchetti per includere 389 coni femminili (Tab. 1)

Poiché la fioritura avviene in modo scalare, è necessario monitorare lo sviluppo dei fiori sulle singole piante per procedere in modo ottimale con le diverse fasi dell'impollinazione controllata. In genere le piante a quote più basse fioriscono prima delle piante situate a quote più alte. I coni femminili vengono isolati con sacchi di terilene quando raggiungono le dimensioni di 2-3 cm. I sacchetti vengono collocati in posizione verticale per lasciare al cono lo spazio per accrescersi dopo l'impollinazione. Nei giorni successivi viene effettuata la raccolta dei coni maschili in base al loro sviluppo, leggermente in anticipo rispetto alla loro apertura. I coni maschili vengono fatti asciugare per 2-3 giorni in ambiente chiuso con

INCROCIO	PIANTA ♀	PIANTA ♂
Cross 1	19M	26M
Cross 2	11M	19M
Cross 3	17M	31M
Cross 4	9M	30M
Cross 5	31M	32M
Cross 6	21M	30M
Cross 7	7M	32M
Cross 8	8M	9M
Cross 9	8M	19M
Cross 10	16M	30M
Cross 11	10M	27M
Cross 12	30M	31M
Cross 13	22M	7M
Cross 14	7M	30M
Cross 15	25M	28M
Cross 16	21M	22M
Cross 17	1M	22M
Cross 18	18M	9M
Cross 19	27M	25M
Cross 20	1M	29M
Cross 21	8M	12M
Cross 22	24M	28M
Cross 23	4M	25M
Cross 24	25M	26M
Cross 25	2M	14M
Cross 26	21M	32M
Cross 27	13M	15M
Cross 28	27M	24M
Cross 29	10M	30M
Cross 30	19M	28M

Tabella 1. Elenco dei 30 incroci raccomandati fra alberi maturi di *A. nebrodensis* ordinati dalla progenie più distante e quindi dagli incroci più convenienti per aumentare la diversità genetica.

deumidificatore in vaschette di plastica, per evitare lo sviluppo di muffe. In base allo sviluppo dei coni femminili, viene effettuata l'impollinazione inserendo all'interno dei sacchetti i coni maschili in fase di apertura, in genere 10-15 coni maschili per strobilo femminile. Per ogni pianta impollinata viene registrato il numero di sacchetti e il numero di coni per ogni sacchetto, indicando la pianta che ha fornito il polline.

I semi ottenuti dall'impollinazione manuale effettuata nel 2020 sono stati seminati nella seconda e terza decade di Dicembre dello stesso anno. La semina è stata effettuata in plateau, ciascuno contenente 35 (5x5x12 cm) celle. In ogni cella sono stati seminati cinque semi. Nel mese di dicembre sono stati utilizzati 140 plateau, per un totale di 24.500 semi seminati. La germinazione è iniziata nei primi giorni di Marzo 2021. Nel Maggio 2021 il tasso di semi germinati variava dal 10% al 60% rivelandosi più alto rispetto al tasso di germinazione registrato per i semi a impollinazione libera raccolti dalle stesse piante madri (Fig. 5).



Fig. 5. Fasi di germinazione di *A. nebrodensis* in plateau per semina nel vivaio di Piano Noce (Polizzi Generosa)

Anche le dimensioni dei coni risultavano diverse tra le piante madri, variando da 9 a 16 cm di lunghezza e da 13,5 a 16 cm di circonferenza. Il peso dei semi raccolti era notevolmente diverso tra le varie combinazioni parentali: da 13 g a 873 g.

La genotipizzazione di un campione di semi ottenuti dagli incroci controllati è molto utile per la valutazione del successo dell'impollinazione manuale. Nell'aprile 2021 è stata effettuata una nuova semina utilizzando 184 plateau e 32200 semi. Così, un totale di 56000 semi derivati da incrocio controllato sono stati seminati in vivaio. Attualmente, a causa del basso tasso di semi pieni, del basso tasso di germinazione, delle perdite fisiologiche e dei danni causati dai roditori, le piantine presenti in vivaio derivanti da coni impollinati manualmente sono circa 5000.

Queste piantine selezionate rappresentano nuovi pool genetici e saranno utilizzate nelle aree di rimboschimento previste nel progetto, intese come nuclei di ridiffusione della specie. La conservazione di *A. nebrodensis* può essere migliorata se viene stabilita una strategia adeguata per migliorare il pool genico e promuovere il futuro dinamismo della specie in relazione alle diverse pressioni biotiche e abiotiche.

CAPITOLO 3

Produzione di piante selezionate in vivaio

Uno dei principali obiettivi del progetto Life4fir è quello di selezionare semenzali ottenuti da esoincrocio attraverso impollinazioni controllate, di allevare le piantine selezionate nel vivaio in condizioni ottimali in modo da ottenere materiale vigoroso e migliorato da utilizzare per la realizzazione di nuovi nuclei di ripopolamento. Per raggiungere questo obiettivo, è necessario attuare in vivaio una serie di attività e misure diversificate.

Nell'ambito del progetto Life4fir, la produzione delle piantine da utilizzare per il rimboschimento nelle aree di proprietà pubblica della Sicilia viene effettuata dal vivaio forestale 'Piano Noce'. Il vivaio si trova a Polizzi Generosa, all'interno del Parco Regionale delle Madonie, a pochi chilometri dalla popolazione naturale di *A. nebrodensis*. Il vivaio è gestito dal DRSRT (Dipartimento Regionale dello Sviluppo Rurale e del Territorio) della Regione Sicilia, tra i beneficiari del progetto Life4fir.

La propagazione e l'allevamento delle piantine di *A. nebrodensis* è un'attività svolta da anni nel vivaio 'Piano Noce', sostenuto da precedenti progetti finalizzati alla conservazione di questa specie. All'inizio del progetto, più di 25000 piante di *A. nebrodensis* sono state censite nel vivaio.

Uno dei principali requisiti del Life4fir, è la produzione di piantine sane e vigorose, con una maggiore variabilità genetica. Per questo motivo, il progetto ha previsto un'azione preparatoria che attraverso una serie di indagini ha permesso di valutare la germinazione e la crescita delle piantine in vivaio, di caratterizzare eventuali stress e disturbi biotici e abiotici e di attuare adeguate misure di mitigazione e controllo.

3.1 Valutazione della germinazione e del tasso di sopravvivenza dopo il trapianto

Presso il vivaio forestale 'Piano Noce' vengono allevate numerose piante (oltre 25.000) di *A. nebrodensis* in fitocelle. Le piante provengono da semine effettuate dal 2003. Prima dell'inizio del progetto erano stati segnalati un basso tasso di germinazione e un tasso di mortalità del 90% dopo il trapianto. Il seme, che deriva dalle piante madri sessualmente mature, è stato raccolto durante i primi dieci giorni di ottobre, prima che i coni si disarticolassero. I coni sono stati raccolti separatamente e conservati in condizioni asciutte e arieggiate. La semina è stata effettuata nella primavera successiva a Marzo-Aprile trasferendo 10-15 semi all'interno di fitocelle 9,5 x 16,5 cm, su un substrato formato da terreno agricolo mescolato con sabbia. La materia prima utilizzata nella miscela proviene da siti non definiti e il substrato viene preparato senza una procedura prestabilita. Il trapianto è stato effettuato nella primavera successiva con rimozione delle piantine e rinvaso sempre su terreno agricolo in fitocelle 14,5 x 24,5 cm (Fig. 6).

I rilievi effettuati all'inizio del progetto Life4fir hanno evidenziato un tasso di germinazione variabile in base al potenziale riproduttivo di ogni singola pianta madre, mentre dopo

il trapianto il tasso di mortalità era di circa il 90%. Da questi dati è nata la necessità di sviluppare un sistema di coltivazione in vaso di *A. nebrodensis* che tenesse conto di parametri fisici e chimici standardizzati in grado di migliorare sia la germinazione dei semi che la crescita delle piantine.



Fig. 6. Piantine trapiantate di *A. nebrodensis* in fitocelle nel vivaio di Piano Noce.

Percentuale di semi pieni

Una procedura basata sull'uso di un dispositivo a raggi X (Gilardoni radiolight) è stata sviluppata all'IBE-CNR per valutare la percentuale di semi pieni e selezionare i semi vitali. Nei semi ottenuti da libera impollinazione raccolti nel 2021 da 11 alberi adulti della popolazione naturale di *A. nebrodensis*, la percentuale di semi pieni variava dallo 0 (ottenuta per l'albero n. 19) al 54% (ottenuta per l'albero n. 7) con un valore medio stimato del 31,7%.

Analisi del substrato

Sono state effettuate analisi chimico-fisiche dei campioni di terreno per verificare le caratteristiche della miscela utilizzata per la germinazione e la coltivazione in vaso delle piante di *A. nebrodensis* nel vivaio di Piano Noce. Sono state analizzate le seguenti proprietà del terreno: pH; conducibilità elettrica (EC) attraverso il metodo dell'estratto di pasta satura; materia organica e contenuto totale di carbonato. I campioni di terreno prelevati dalle piante in vaso sono risultati variare soprattutto nei livelli di salinità (CE) e nel contenuto totale di carbonato. Così, è emersa la necessità di standardizzare la preparazione del substrato utilizzato per la semina e il trapianto, per renderlo perfettamente adatto alle esigenze delle piante di *A. nebrodensis*: un pH di 5,5-6,0, un'adeguata capacità di ritenzione dell'acqua e dell'aria, elevata porosità e buona concentrazione di materia organica.

Tra i diversi substrati testati, i risultati migliori sono stati ottenuti con il terreno Vigorplant completo, addizionato con Agriperlite (nel rapporto 70 lt + 10 lt) (Fig. 7), con il quale è stata osservata un'apercentuale di germinazione variabile dal 20 all'80% tra i diversi lotti di semi, con una media del 31,4%.



Fig. 7 Terriccio Vigorplant completo, aggiunto di agriperlite

Utilizzo di vassoi di semina

La scelta di questo tipo di contenitore si è basata su alcuni fattori importanti quali: maneggevolezza in vivaio, buona germinazione, elevata densità di carico per metro quadrato, ridotta richiesta di spazio e, soprattutto, minore stress da trapianto per i semenzali. Quest'ultima assume una notevole importanza, in quanto oltre il 90% delle perdite in vivaio sono state registrate al momento del trapianto (Raimondo, F., & Schicchi, R. 2005). In realtà l'estrazione delle piantine dalle fitocelle provoca frequenti rotture del fittone con conseguente

morte delle piantine. La semina in vassoi evita questo tipo di problema in quanto l'apparato radicale (radici e terreno) viene estratto con tutto il pane di terra e rimane intatto. In ogni singola cella sono stati posti 5 semi per la germinazione (Fig. 8).



Fig. 8. Semenzali di *A. nebrodensis* in plateau per la semina nel vivaio Piano Noce.

DESCRIZIONE		TIPO 350
Dimensioni vassoio	cm	30,0 x 48,5
Numero di celle	n.	35
Dimensioni celle	c.c.	350
Dimensioni maggiori cella	cm	6,1 x 5,8
Dimensioni minori cella	cm	3,4 x 3,8
Profondità	cm	16
Spessore	mm	1,6
Colore		negro
Numero semi / m ²	n.	240

Tabella 2. Caratteristiche dei plateau per la semina utilizzati al vivaio Piano Noce

3.2 Insorgenza e frequenza dei disturbi

Per ogni lotto, pianta madre, anno di semina ecc. le piantine in vaso sono state contate e sottoposte ad ispezione visiva per identificare gli organi danneggiati, registrando la mortalità e i diversi tipi di sintomi osservati, la loro frequenza e l'impatto (in termini di percentuale di corona danneggiata) (Tab. 3). Questo ha portato ad ottenere un quadro delle dimensioni di ogni progenie e della frequenza dei sintomi osservati tra e all'interno delle progenie.

	Parcella 1		Parcella 14		Parcella 15		Totale	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Mortalità	459	5,04	7	0,34	142	1	608	2,4
Aghi arrossati	145	1,6	10	0,5	117	0,81	272	1,07
Clorosi	190	3,82	17	0,84	764	5,35	971	3,82
Defogliazione	9	0,1			35	0,24	44	0,17
Microfillia					6	0,04	6	0,02
Rametti disseccati	12	0,13	4	0,19	8	0,08	24	0,1
Accrescimento ridotto			47	2,32	64	0,45	111	0,43

Tabella 3. Frequenza (come numero e percentuale) dei principali sintomi osservati nelle parti aeree delle piantine che si sviluppano in tre appezzamenti del vivaio.

3.3 Campionamenti per isolamenti fungini

Campioni di aghi e rametti sono stati prelevati dalle piantine sintomatiche per ulteriori osservazioni in laboratorio. I campioni sono stati accuratamente controllati per definire in dettaglio i segni di colonizzazione da parte di agenti patogeni (reazione dei tessuti, corpi fruttiferi di funghi, ecc.) e per l'isolamento in vitro di microrganismi fungini. Gli isolamenti sono stati eseguiti da aghi (arrossati, completamente o parzialmente necrotizzati) e da germogli disseccati, dopo sterilizzazione superficiale. Le colonie ottenute sono state raggruppate in morfotipi in base alle loro caratteristiche culturali. I morfotipi sono stati distinti in base alla loro morfologia (micelio e strutture riproduttive) e al sequenziamento di specifiche regioni di DNA genomico (ITS1-ITS4).

3.4 Valutazione della presenza di agenti patogeni del suolo

La clorosi e la defogliazione delle piante sono sintomi generici che possono essere dovuti a varie cause, sia biotiche che abiotiche. Il mezzo di coltivazione delle piante in vaso è una miscela di terriccio, torba e sabbia. Questo substrato può ospitare microrganismi patogeni (funghi, batteri, nematodi) o, se i vasi sono posti a terra, i microrganismi nocivi possono passare all'interno della miscela e danneggiare le piante. Il commercio di piante ornamentali è riconosciuto come una via principale per l'introduzione di agenti patogeni delle piante

aliene.

L'azione di oomiceti del suolo molto pericolosi, come *Phytophthora* sp, non può essere trascurata in ambiente vivaistico. Questo oomicete attacca il sistema radicale delle piante causando deterioramento generalizzato della parte epigea (crescita stentata, clorosi, defogliazione). Per questo motivo è opportuno che i campioni di suolo e di radici prelevati dai vasi delle piante colpite da clorosi, defogliazione, avvizzimento e declino generale vengano sottoposti a isolamenti in laboratorio. Particolare attenzione dovrebbe essere prestata quando i sintomi del declino e della morte si diffondono in un'area o in un appezzamento del vivaio, colpendo molte piante contigue.

La presenza di *Phytophthora* può essere determinata attraverso i metodi tradizionali che usano un'esca e l'isolamento diretto dal suolo, dai detriti organici e dalle radici. L'amplificazione PCR del DNA ribosomale relativo all'Internal Transcribed Spacer (ITS) tramite i primers ITS4 e ITS6 seguita dal sequenziamento dell'amplicone è utile per l'identificazione di *Phytophthora*.

Tra gli agenti patogeni fungini che risiedono nel suolo dei vivai forestali, frequenti sono anche *Cylindrocarpon* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Pythium* spp., *Rosellinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp.

3.5 Misure di ecofisiologia

Lo studio delle relazioni idriche (componenti del potenziale idrico xilematico delle piante) si propone di stabilire nel dettaglio il tipo di strategia che la pianta adotta per resistere al deficit idrico e, contestualmente, individuare degli indicatori semplici ed efficaci da utilizzare per poter delimitare le linee operative per la gestione della risorsa idrica, ovvero l'irrigazione delle piante in vaso in vivaio nel caso concreto. In ecologia, la tecnica delle curve pressione-volume (P-V) permette di descrivere la relazione tra il potenziale idrico totale (Ψ_t) e le sue componenti in funzione del contenuto idrico relativo (R) degli organismi viventi.

A Luglio e Novembre 2020 sono stati campionati, due gruppi, ciascuno di 5 piante in vaso di *A. nebrodensis*, di 10-12 anni e di 4 anni. Le curve P-V sono state ottenute seguendo un metodo di disidratazione progressivo, utilizzando rametti dello stesso anno e di dimensioni comparabili tra i diversi campioni. Sono stati registrati i valori del potenziale idrico nel punto di perdita del turgore ($\Psi_{t(p)}$) e del potenziale osmotico in condizioni di pieno turgore (π_0). Sono state ottenute quattro curve P-V per ciascun gruppo di età. I risultati hanno indicato che le piante in vaso più giovani (4 anni) non erano più sensibili alla disidratazione rispetto alle piante in vaso di 10-12 anni. Inoltre, tra Luglio e Novembre, le piante in vaso di entrambi i gruppi di età non avevano attivato meccanismi di osmoregolazione per adattarsi ad una carenza d'acqua. Quindi, nel lasso di tempo considerato, le piante campionate nel vivaio non sono state soggette a carenza d'acqua, e il regime di irrigazione può essere considerato

adeguato.

3.6 Micorrizzazione

La micorrizza, che significa "fungo-radice", è definita come una relazione benefica o mutualistica tra un fungo e le radici della sua pianta ospite. Questa relazione è un'infezione naturale dell'apparato radicale che interessa naturalmente circa il 90 % dei taxa vegetali, in cui la pianta fornisce al fungo zuccheri e carbonio e riceve acqua e/o nutrienti minerali in cambio. Questo tipo di rapporto è nato circa 400-500 milioni di anni fa, da quando le piante hanno cominciato a crescere sulla terra. Esistono migliaia di specie diverse di funghi micorrizici.

Tipi di funghi micorrizici

Le micorrize sono classificate in tre tipi, in base alla posizione delle ife fungine rispetto ai tessuti radicali. Nell'endomycorizza i funghi producono ife all'interno delle radici in spazi intra e intercellulari; nell'ectomicorizza l'infezione fungina si diffonde tra le cellule degli strati esterni delle radici; nelle ectoendomycorizze i funghi invadono le radici colonizzando gli strati esterni delle cellule corticali in modo inter- e intracellulare. Gli scambi trofici avvengono nei siti di contatto tra le cellule e le ife. Nella micorrizza arbuscolare (AM), il tipo più comune di endomycorizze (EM) che interessa la maggior parte delle specie vegetali di interesse agricolo, le ife invadono le cellule della corteccia radicale, senza danneggiare la membrana cellulare, sviluppano ramificazioni dicotomiche e producono una struttura simile ad un piccolo albero, chiamato arbuscolo. Queste strutture sono considerate il principale sito di scambio tra il fungo e l'ospite.

Benefici

La maggior parte delle piante nel mondo traggono benefici dai funghi endomycorizici. I funghi ectomicorizici, che rappresentano circa il 3% delle micorrize, sono più evoluti e ne beneficiano principalmente le specie legnose e arboree. In totale, l'80-90% delle specie vegetali traggono vantaggi dal rapporto con i funghi micorrizici. Le piante che non rispondono alle micorrize includono alcune Brassicaceae, Caryophyllaceae e poche altre specie. Il principale vantaggio che i funghi micorrizici forniscono è l'accesso a grandi quantità di acqua e sostanze nutritive (in particolare azoto, fosforo, zinco, manganese e rame). Questo perché le ife aumentano la superficie di assorbimento della radice dal suolo. Le ife micorriziche hanno un diametro inferiore rispetto alle radici delle piante e possono raggiungere aree non disponibili alle radici. Altri benefici segnalati della micorrizza includono: maggiore resistenza ai patogeni, maggiore tolleranza alla siccità e alla salinità, maggiore successo nei trapianti, maggiore resa delle colture con una maggiore fioritura, maggiore assorbimento di acqua e nutrienti, migliore struttura del suolo.

Uso, prodotti e costi

Le micorrize vengono utilizzate in vigneti, frutteti, vivai, in agricoltura, o in progetti di bonifica. L'uso di funghi micorrizici è diffuso anche nella produzione biologica. In alcuni casi i funghi micorrizici vengono inoculati artificialmente nella pianta ospite per ottenere corpi fruttiferi (tartufo, *Boletus* spp., *Amanita caesarea*, ecc.). È importante notare che le micorrize possono essere trovate naturalmente nella maggior parte dei terreni, quindi l'applicazione di inoculi fungini potrebbe non essere necessaria. La maggior parte dei substrati privi di suolo non contiene funghi micorrizici, che però possono essere inoculati nei contenitori di crescita. Gli inoculi micorrizici si possono trovare in forma granulare, in polvere o in soluzione concentrata.

Applicazioni

L'applicazione di funghi micorrizici nella produzione può essere condotta come inoculazione diretta di durante il trapianto, incorporandoli nel mezzo o nel terreno o applicandoli attraverso l'irrigazione. L'inoculo può riprodursi in condizioni ideali, come l'aggiunta di pacciamme e compost. Sono da evitare acqua e concimazione eccessiva. Tuttavia, l'irrigazione, la raccolta e la rotazione delle colture possono influenzare il rapporto radice-fungo. Alcuni funghi possono colonizzare le nuove radici in una settimana, mentre altri possono impiegare oltre un mese.

Uno degli obiettivi del progetto Life4fir è la micorrizzazione delle piantine selezionate, ottenute da impollinazione controllata e allevate in vaso.

In assenza di dati scientifici sulla micorrizzazione di *Abies nebrodensis*, è stato selezionato il Basidiomicete *Pisolithus tinctorius* (Pers.), noto come simbionte ectomicorrizico in specie vicine ad *A. nebrodensis* quali *A. alba* e *A. chephalonica* (Castellano e Trappe, 1991; Rincòn et al., 2001; Krajña Kova et al., 2012). Questo gasteromicete epigeo è caratterizzato dall'elevata produzione di corpi fruttiferi durante tutto l'anno e dall'elevata quantità di basidiospore che germinano facilmente in presenza di radici di piantine. Queste caratteristiche lo rendono un simbionte mutualistico ideale anche nei saggi di inoculazione artificiale e nelle formulazioni ectomicorriziche commerciali. Inoltre, per la conservazione a lungo termine dell'inoculo fungino, i corpi fruttiferi di *P. tinctorius* possono essere disidratati sotto flusso d'aria a temperatura ambiente per 48 ore e conservati fino ai test di inoculazione. In questo caso, le spore devono essere riattivate in acqua distillata sterile e mantenute a 4 °C per 12-18 ore prima dell'inoculazione delle piantine. Per facilitare l'interazione tra i due simbionti, si raccomanda l'inoculazione con sospensione di spore durante il trapianto.

L'inoculazione di piantine di un anno di *A. nebrodensis* è stata effettuata in inverno (Dicembre 2021) durante il trapianto. In particolare, 20 ml di sospensione di spore di *P. tinctorius* alla concentrazione di 107 spore per pianta sono stati inoculati direttamente sull'apparato radicale delle piantine (Fig. 9).



Fig. 9. Inoculazione della sospensione sporale di *P. tinctorius* in piantine trapiantate di *A. nebrodensis*.

Le piantine sono state trasferite in serra e regolarmente irrigate per accelerare la colonizzazione fungina. Alla fine dell'estate 2022 (inizio Settembre) è stata effettuata la valutazione dell'efficacia della micorrizzazione. Sono stati misurati diversi parametri per controllare gli effetti della micorrizzazione: stato generale di crescita vegetativa, l'altezza delle piantine (distanza dal colletto radicale al germoglio apicale), il diametro del collare radicale, l'indice di micorrizzazione (IM = numero di apici radicali/lunghezze totali dei frammenti di radice), il peso secco dell'apparato radicale e della parte aerea. Le piantine inoculate mostravano aghi di colore verde intenso e una migliore crescita vegetativa, con la produzione dei primi rami laterali, rispetto alle piantine non inoculate. In media, le piantine inoculate risultavano più alte di quelle non inoculate (circa 1,5 cm di differenza), con un colletto radicale più spesso (2 mm vs. 1 mm) e un IM più alto (7,84 vs 6,25). Di conseguenza sono state rilevate differenze nel peso secco delle piantine inoculate e dei controlli. Infatti, la parte aerea e l'apparato radicale delle piantine inoculate erano rispettivamente due e tre volte più pesanti di quelle non inoculate.

CAPITOLO 4

Indagine fitosanitaria sugli alberi di *Abies nebrodensis* e controllo degli stress biotici e abiotici

Il monitoraggio dello stato sanitario delle aree forestali naturali fornisce le conoscenze di base sulle minacce esistenti, e permette di individuare misure di protezione e conservazione adeguate. Inoltre, le informazioni raccolte possono fornire indizi per comprendere l'influenza sugli ecosistemi forestali esercitata da fenomeni come il cambiamento climatico e l'introduzione di specie invasive. Gli effetti dei cambiamenti climatici sulle foreste sono già stati osservati in Europa e si teme che la mortalità degli alberi aumenti a causa dello stress fisiologico, dei focolai di insetti e degli incendi. Le evidenze indicano che in Europa le foreste più vulnerabili siano quelle Mediterranee che, a causa dell'innalzamento delle temperature, vedranno aumentare il rischio di incendi boschivi, attacchi parassitari e desertificazione. Nel contesto della conservazione delle specie minacciate, il monitoraggio è essenziale per rilevare le tendenze di abbondanza e distribuzione nel tempo, misurare gli impatti dei fattori di stress e valutare l'efficacia delle risposte gestionali (Legge et al. 2018). Il monitoraggio è anche importante per la tutela, per garantire gli investimenti gestionali ed è un potente strumento di comunicazione che consente il coinvolgimento di una vasta gamma di stakeholders. Un monitoraggio efficace è utile per informare soggetti coinvolti nei processi decisionali e nella gestione forestale al fine di migliorare la conservazione delle specie minacciate (Lindenmayer et al. 2013). La fragile esistenza di queste specie richiede inoltre che il monitoraggio abbia un'adeguata precisione e sensibilità per rilevare sottili cambiamenti nelle popolazioni e per una gestione funzionale (Martin et al. 2007, 2012). I programmi di monitoraggio-gestione dovrebbero iniziare definendo e valutando prioritariamente i fattori di stress che interessano una specie ed essere mirati allo sviluppo di misure di monitoraggio e conservazione compatibili e alla definizione di azioni di gestione. Nella progettazione di un programma adatto allo scopo, è importante potersi avvalere di approcci innovativi, di metodi economicamente convenienti e/o che consentano l'ottenimento di dati specifici. Ad esempio, i progressi nella tecnologia dei droni possono risultare in una maggiore precisione nell'acquisizione dei dati (Hodgson et al. 2016) ed eDNA ha dimostrato di essere uno strumento efficace nel monitoraggio di alcune specie in pericolo (Thomsen et al. 2012); entrambe le tecniche promettono benefici in termini di costi.

4.1 Monitoraggio degli alberi di *A. nebrodensis* all'interno di LIFE4FIR

L'azione C1 del progetto Life4fir 'Sostegno e conservazione di *Abies nebrodensis* nel suo habitat naturale' si basa su una serie di attività volte a preservare gli alberi relitti di questa popolazione naturale unica, attraverso il monitoraggio e il controllo delle loro minacce (conservazione in situ). Questi includono i risultati e le informazioni ottenute dalle indagini condotte nell'ambito della sottoazione C1.5 'Analisi spaziale e sanitaria della popolazione

naturale di *A. nebrodensis* tramite drone.

Oltre alla minaccia costituita dagli erbivori selvatici (soprattutto daini e cinghiali), negli anni sono stati osservati anche sporadiche alterazioni sulle chiome di *A. nebrodensis* (Fig.10).



Fig. 10. Esempi di arrossamento degli aghi e disseccamenti sulla chioma di *A. nebrodensis* nella popolazione naturale.

Nell'ambito del progetto Life4fir è stato utile descrivere i sintomi, indagando sulle cause dei disturbi osservati e monitorandone l'evoluzione in relazione alle condizioni ambientali e ai cambiamenti climatici. Il progetto prevede lo svolgimento di indagini fitopatologiche sulla popolazione naturale dell'abete delle Madonie per rilevare e monitorare l'insorgenza e l'estensione dei disturbi biotici o abiotici ed eventualmente attuare adeguate misure di controllo. Il monitoraggio delle condizioni sanitarie mediante indagini periodiche ha anche lo scopo di valutare l'effetto delle misure di protezione che saranno attuate nel corso del progetto sugli alberi relitti.

Le indagini sulla salute delle piante si sono basate su ispezioni visive dei singoli alberi insieme all'analisi multispettrale per monitorare eventuali disturbi fisiologici a livello della chioma.

4.2 Ispezioni e campionamenti degli alberi

Ogni anno gli alberi sono stati sottoposti ad un attento esame visivo per valutarne lo stato di salute sulla base di osservazioni sulla forma della chioma e la trasparenza, il cambiamento di colore del fogliame, la presenza di parti deperienti, essiccate o danneggiate, il verificarsi di lesioni. I disturbi osservati sulle chiome sono stati descritti separatamente, registrando il tipo di organo interessato (tronco, rami, ramoscelli, germogli, aghi), la porzione della chioma coinvolta, idealmente divisa in tre parti lungo l'asse longitudinale (inferiore, intermedio e terzo superiore), la direzione (nord, sud, est e ovest), l'impatto in termini di percentuale di chioma danneggiata.

Le analisi di laboratorio sono state condotte sui campioni raccolti attraverso osservazioni allo stereomicroscopio, isolamento e coltura di colonie fungine e loro caratterizzazione genetica attraverso amplificazione PCR e sequenziamento dei loci bersaglio (Fig. 11)

Questo ha permesso di identificare la microflora fungina associata ai disturbi osservati e di rilevare la presenza di agenti patogeni nocivi.

Le indagini effettuate hanno permesso di raggruppare le piante della popolazione naturale in base al grado di danneggiamento del fogliame, alla posizione dei sintomi sulla chioma e in base ai principali tipi di sintomi osservati (germogli e rametti arrossati, defogliazione, ferite da erbivori, clorosi, essiccazione di rametti). Gli isolamenti fungini hanno escluso il coinvolgimento di agenti patogeni aggressivi tra le cause dei disordini osservati. Tutti i funghi isolati sono stati classificati come patogeni di debolezza, endofiti o saprofiti, il cui sviluppo sulla pianta è associato a disturbi ambientali a cui gli alberi sono sottoposti nel loro habitat naturale, come siccità estiva, gelate tardive, le alte temperature raggiunte dalle rocce nude durante l'estate e l'intensa radiazione solare, oltre ai danni causati dagli erbivori selvatici, in particolare i daini che si sono riprodotti massicciamente nel territorio del Parco negli ultimi anni.

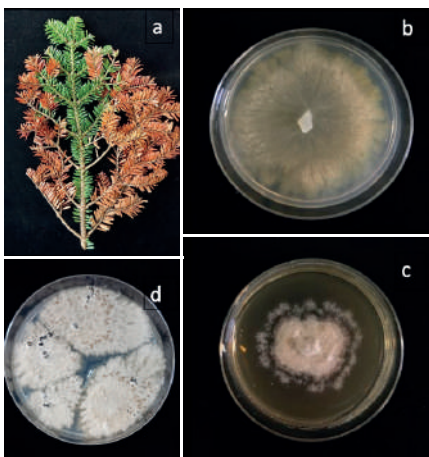


Fig. 11. a) Un rametto con aghi arrossati e defogliazione, oggetto del campionamento. Isolati fungini più frequentemente campionati da aghi arrossati di *A. nebrodensis* cresciuti in piastre contenenti PDA (Patate Destrosio Agar;

b) *Cytospora pini*;

c) *Rhizosphaera oudemansii*;

d) *Pestalotiopsis funerea*.

4.3 Indagini sul microbioma fungino

Il microbioma della pianta (fitobioma), è definito come l'insieme completo dei genomi microbici connessi con una pianta ospite. L'importanza della flora microbica associata alle piante per la tutela della loro salute e nutrizione è universalmente accettata. In particolare, alcuni funghi e batteri favoriscono la crescita delle piante e aumentano la resistenza allo stress. Molteplici studi hanno anche dimostrato che il danno degli erbivori negli ecosistemi forestali è chiaramente influenzato dalle interazioni tripartite tra alberi, insetti e loro microbiomi. Tuttavia, non tutti gli organismi simbiotici forniscono benefici all'ospite, in quanto le interazioni vegetali-microbiche possono anche essere neutre (comunemente indicate come commensalismo) o addirittura deleterie per l'ospite (parassitismo o patogenicità). Nel corso del progetto Life4fir, è stata intrapresa la caratterizzazione del microbioma fungino in germogli e rametti sani e sintomatici di *A. nebrodensis* per conoscere la biodiversità dei funghi epifiti e endofiti che risiedono nella chioma, in relazione alle diverse condizioni fisiologiche dei tessuti e alle diverse condizioni dell'habitat degli alberi

4.4 Indagini UAV e analisi multispettrale

La sempre più importante perdita di superfici boscate favorisce l'uso di nuove tecnologie per individuare le aree in cui si nota un forte impatto delle diverse fonti di stress. La tecnologia dei droni può essere utilizzata per valutare la salute di aree boscate utilizzando diverse immagini ad alta risoluzione con un basso impatto economico.

Gli stress biotici o abiotici agiscono sulla fisiologia e biochimica degli alberi modificando la radiazione assorbita o riflessa dalla chioma. Attraverso telecamere multispettrali si può misurare la radiazione visibile e infrarossa riflessa dalle piante.

Durante la fase iniziale del progetto è stata condotta un'indagine sullo stato di salute di *Abies nebrodensis* e della vegetazione circostante (indici spettrali) mediante una tecnologia di telerilevamento basata sull'uso di un drone (UAV - Unmanned Aerial Vehicle) dotato di una macchina fotografica digitale e di una telecamera iperspettrale. Un secondo rilievo drone è stato pianificato entro la fine del progetto per confrontare lo stato di salute dell'habitat dopo l'attuazione delle misure di protezione previste.

Nel rilievo sono state utilizzate due fotocamere: 1) fotocamera convenzionale RGB attraverso la quale le immagini scattate vengono geolocalizzate. È stata realizzata un'ortofoto del terreno e un modello di elevazione digitale per trovare correlazioni tra i tratti topografici e le sollecitazioni ambientali. 2) Telecamera multispettrale per ottenere 4 immagini simultanee per ogni banda (rosso, red edge, verde, vicino infrarosso). Utilizzando queste immagini, sono state create mappe di riflettanza dalla cui combinazione possono essere ottenuti diversi indici di vegetazione. Questi indici saranno specificamente impostati per produrre un valore che rappresenti la quantità o il vigore della vegetazione.

I fotogrammi (in RGB e nello spettro del verde, rosso, red edge e vicino infrarosso) sono stati allineati e, attraverso la procedura Structure from Motion (SfM), è stato creato un insieme di

punti successivamente utilizzato per ottenere l'ortofoto e la produzione di modelli digitali del terreno (DTM) e superfici (DSM), attraverso la procedura di triangolazione.

Il DTM (Digital Terrain Model) dell'area in cui è presente la popolazione naturale di *A. nebrodensis*, rimodellato in 3D, ha permesso di segnalare la distribuzione degli alberi in relazione alla morfologia del territorio (Fig. 12).



Fig. 12. Modello digitale del suolo rimodellato in 3D della popolazione di *A. nebrodensis* distribuita lungo il Vallone Madonna degli Angeli, Monte dei Pini e Monte Cavallo.

L'ortofoto della gamma naturale di *A. nebrodensis* può essere utilizzata come mappa, per misurare le distanze reali e come un sistema informativo geografico (GIS). Inoltre, è possibile combinare l'immagine o i risultati della sua elaborazione con altre mappe o con i punti che rappresentano la "ground truth".

Solo per le immagini multispettrali, rilevate in ROSSO (Rosso), REG (Red edge), VERDE (Verde), NIR (Vicino infrarosso), le mappe di riflettanza sono state prodotte dopo un'adeguata calibrazione della telecamera effettuata mediante un sensore di luce montato sul drone e utilizzando i valori di riflettanza ottenuti dal pannello di calibrazione.

La valutazione del grado di defogliazione della foresta attraverso questi sensori viene valutata tramite il potenziale di riflettanza delle foglie nel NIR. Il 50% della radiazione viene riflessa dalla copertura della area boscata se questa risulta in buona salute. Uno stato di defogliazione della foresta diminuisce la riflettanza del NIR.

Le immagini a infrarossi mostrano in rosso la riflettanza della copertura della chioma degli alberi. La riflettanza spettrale si basa sull'assorbimento esercitato dall'acqua e dalla clorofilla nella foglia. Sono state rilevate varie zone d'ombra all'interno della vegetazione a causa del tipo, salute, struttura di foglia e contenuto di umidità delle piante (Fig. 13).

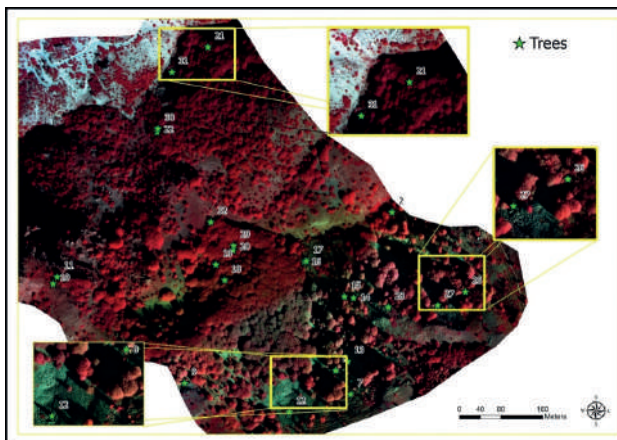


Fig. 13. Mappa all'infrarosso dell'area 1, che include il nucleo principale della popolazione di *A. nebrodensis*, con alcuni siti ingranditi in cui si possono distinguere le singole piante.

Le immagini multispettrali sono state adeguatamente analizzate per la produzione di una mappa NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), cioè di un indicatore che descrive l'intensità e la distribuzione del verde, la densità relativa e la salute della vegetazione per ogni elemento dell'immagine, o pixel, in un'immagine ottenuta con drone (Fig. 14).

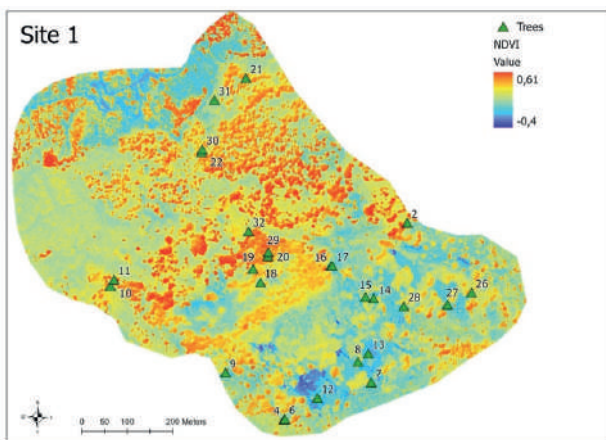


Fig. 14. Mappa NDVI dell'area 01, comprendente il nucleo principale della popolazione di *A. nebrodensis*.

I valori NDVI possono variare da +1.0 a -1.0. L'NDVI dell'habitat di *A. nebrodensis* è risultato variare tra -0,4 e +0,61 e le aree in cui l'indice era superiore a 0,5 (aree rosse e arancioni), che corrispondevano alla presenza di una fitta vegetazione, si sono rivelate piuttosto limitate. Le mappe ottenute sono utili per condurre un'indagine comparativa sullo stato sanitario dei singoli alberi in relazione alle condizioni ambientali attraverso un'analisi di autocorrelazione spaziale. Effettuando un secondo rilevamento col drone prima della fine del progetto, le mappe multispettrali permetteranno di monitorare l'evoluzione nel tempo dello stato di salute degli alberi in funzione delle fluttuazioni climatiche e delle misure di conservazione che verranno attuate nel frattempo.

Capitolo 5

Sostegno alla rinnovazione naturale di *Abies nebrodensis*

La rigenerazione naturale è un processo biologico che può essere assistito e gestito per aumentare la copertura forestale e raggiungere il recupero dell'ecosistema nativo o di alcune delle sue funzioni. Il ripristino ecologico si basa su processi di rigenerazione naturale per il recupero dell'ecosistema forestale. Oltre a migliorare la resilienza e fornire molteplici beni e servizi ecosistemici, la rinnovazione naturale può essere molto efficace per recuperare la biodiversità locale e le interazioni tra specie.

Con la rinnovazione naturale la biodiversità locale è arricchita da: 1) propagazione naturale di alberi e arbusti tramite seme, polloni radicali, ceppaie o cedui; 2) rigenerazione di fonti genetiche locali adattate alle condizioni pedoclimatiche locali; 3) impollinatori, erbivori e agenti di dispersione dei semi degli alberi che si insedieranno. Molti di questi benefici possono essere ottenuti anche utilizzando approcci di semina diretta e piantagione, ma con sforzi e costi significativamente più elevati. Per promuovere la rinnovazione naturale è necessario che siano soddisfatte alcune condizioni ecologiche: bassi livelli di disturbo del suolo e mantenimento degli strati superiori; vicinanza a residui o aree boscate che permettano la colonizzazione di nuove superfici a partire da semi dispersi, polloni radicali; protezione da incendi, pascolo e prelievo; presenza minima di erbe e arbusti infiammabili, e specie invasive che possono ostacolare l'insediamento delle nuove piantine. Se alcune di queste condizioni non sono presenti, l'impianto di specie miglioratrici, il diserbo o l'impianto intensivo possono essere necessari per ripristinare la copertura forestale. Condizioni ecologiche favorevoli per la rinnovazione naturale sono associate a particolari contesti sociali e legislativi sull'uso del territorio.

5.1 La rinnovazione naturale di *Abies nebrodensis*

Vari fattori limitano la crescita e l'insediamento della rinnovazione naturale della popolazione di *Abies nebrodensis*: i suoli superficiali e rocciosi, la fioritura e la fruttificazione irregolari nel corso degli anni, l'alto tasso di autofecondazione e l'alta percentuale di semi vuoti, l'impatto degli erbivori selvatici che si nutrono delle piantine (Fig. 15).



Fig. 15. Coni maturi di *A. nebrodensis* per la raccolta dei semi.

Spesso l'azione di disturbo localizzato (azione di scavo di cinghiali, pascolo di daini e bestiame ecc) ha ostacolato la sopravvivenza delle piantine nel recente passato. Nel 2005, un'indagine condotta al termine del precedente progetto Life Natura (LIFE2000NAT/IT/7228) "Conservazione in situ ed ex situ di *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei", riportava che la rinnovazione naturale nell'area naturale consisteva in 80 piantine di età compresa tra due e oltre 20 anni, trovate in prossimità di otto delle ventiquattro piante della popolazione naturale giunte a maturità. Nell'indagine condotta nel 2014 il numero di piante madri è salito a 11 e sono state censite 274 piantine. L'aumento del numero di piantine rilevate indica un'inversione nella dinamica della popolazione di *Abies nebrodensis*. Le piante giovani della rinnovazione naturale crescono principalmente tra gli arbusti a cuscino di *Juniperus hemisphaerica* e *Genista cupanii*, oppure sotto la copertura dei faggi, dove trovano condizioni microclimatiche favorevoli e protezione dai morsi degli erbivori. Inoltre, la presenza di uno strato di muschio aumenta il contenuto di acqua nel terreno, che è essenziale per la sopravvivenza delle piantine (Fig. 16).



Fig. 16. Giovani piantine della rinnovazione naturale nate sotto la copertura di *Fagus sylvatica* e in corrispondenza di uno strato di muschio.

5.2 Censimento e mappatura dei delle piante giovani della rinnovazione naturale

Il censimento e la mappatura delle giovani piante sono stati effettuati per tracciare e monitorare l'evoluzione della rinnovazione naturale, nonché per ottimizzare la funzione protettiva delle nuove recinzioni. Indagini sono state condotte nell'ambito del progetto Life4fir in estate e autunno 2020 per l'individuazione e l'identificazione della rinnovazione naturale della popolazione di *A. nebrodensis*.

Per effettuare ispezioni esaustive sul campo, è stato sviluppato un protocollo di indagine basato sulla misurazione della distanza in metri e dell'angolo di azimut tra ogni pianta o piantina e rispettivo (e supposto) albero madre, attraverso l'uso di una bussola professionale. Sono state preparate tabelle di rilevamento contenenti i parametri da registrare: numero dell'albero madre (MP) e posizione con GPS, Id della piantina, distanza da MP, azimut, altezza (cm), età, stato vegetativo e di salute, eventuali note. I dati raccolti sono stati utilizzati per l'implementazione di una banca dati completa e 15 mappe, una per ogni pianta madre (Fig. 17).

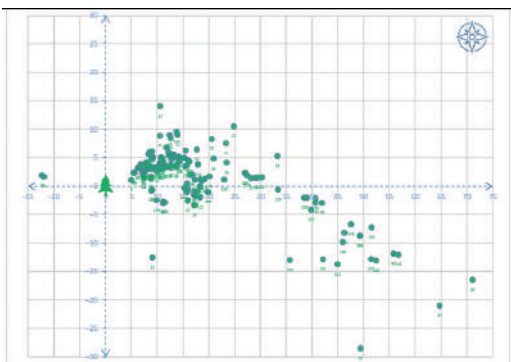


Fig. 17. Mappa della distribuzione della rinnovazione naturale della pianta madre n. 10.

Sulla base delle esperienze di precedenti rilievi, tra cui l'ultimo risalente al 2014, non sono più stati utilizzati i picchetti con etichette per segnalare le giovani piante. Infatti, quelli utilizzati nelle indagini precedenti sono stati staccati e masticati dai cervi dopo un paio di settimane dal loro impianto.

5.3 Consistenza e localizzazione della rinnovazione naturale

I rilievi sulla rinnovazione naturale hanno permesso di individuare e registrare un totale di 484 piantine di *A. nebrodensis*, suddivise tra 15 piante madri. Questi dati sono estremamente significativi considerando che nella precedente indagine condotta nel 2014 sono state registrate undici piante madri con 274 accessioni. Infatti, le nuove segnalazioni riguardano la pianta madre n. 2, con 3 accessioni; la madre n. 13 con 4 accessioni; la madre n. 20, con 4 accessioni e la n. 11, con 31 accessioni. Le piante madre con il maggior numero di piantine registrate sono la n.10 (169 piantine), la n. 22 con 87 piantine, la n. 21 con 58 piantine e la n. 18 con 43 piantine. L'età delle piante giovani varia fra 1 e 24 anni (Tab. 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
Tot.	351	133	484	127	357

Tabella 4. Tabella riassuntiva sull'ammontare della rinnovazione naturale di ogni pianta madre rilevata nel 2020.

L'analisi delle mappe di distribuzione ha mostrato che si va affermando una lenta rinnovazione naturale di *A. nebrodensis* intorno alla maggior parte degli alberi maturi. I siti dove la rinnovazione è maggiormente frequente sono quelli protetti, ove la radicazione è più agevole, come siti ombrosi e umidi vicino a faggeti, querce o lecci, o arbusti a cuscino di ginepro e ginestra, strati di muschio e sporgenze rocciose rivolte a nord. La rinnovazione naturale è stata ritrovata a distanze fino a settanta metri da un albero madre. Ad esempio, la piantina 10/82 è stata trovata a 71 metri a sud-est dell'albero madre n. 10 (Fig. 5) e la piantina

8/23 è stata trovata a 65 metri vicino a un ceppo di faggio, lungo il sentiero situato a monte dell'albero madre n. 8 (Fig. 6).

Un confronto con i dati raccolti nella precedente indagine del 2014, evidenzia che le piantine di *Abies nebrodensis* sono andate soggette ad un tasso di mortalità rilevante. Ad esempio, nel caso dell'albero madre n. 22, nel 2014 sono state segnalate 47 piantine di un anno, mentre solo 21 piante con un'età compatibile (5/7 anni) sono state trovate nel 2020, mostrando un tasso di mortalità del 55%. Per l'albero madre n. 29, 28 piantine di circa un anno di età sono state rilevate nel 2014, oltre a 8 piante affermate. Ad oggi sono state rinvenute 7 delle 8 piante stabilite, ma nessuna delle piantine registrate nel 2014. Invece, sono state trovate 12 nuove piantine di meno di due anni. Pertanto, in questo caso si è verificata una mortalità del 100% di piantine.

5.4 Il nuovo sistema di recinzioni

Per favorire la sopravvivenza e l'affermazione della rinnovazione naturale, le recinzioni allestite intorno agli alberi adulti *A. nebrodensis* hanno avuto una notevole importanza, evitando interferenze esterne nei processi di germinazione dei semi e sviluppo delle piantine. Il primo sistema di recinzione per la protezione dell'abete delle Madonie risale al 1950 e a causa del suo deterioramento nel tempo, è stato sostituito con nuove recinzioni costruite negli anni successivi. Prima del progetto Life4fir, le ultime recinzioni risalivano dal precedente progetto LIFE-Natura 2000 "Conservation in situ and ex situ of *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei" realizzato tra il 2000 e il 2005.

Il progetto Life4fir ha pianificato l'estensione e il rafforzamento del sistema di recinzioni intorno agli alberi *A. nebrodensis* per soddisfare due esigenze fondamentali: 1) la maggior parte delle recinzioni esistenti ha mostrato nuovamente segni di deterioramento e sono state danneggiate dalla massiccia popolazione di daini e cinghiali, avendo perso gran parte della loro funzionalità; 2) molte piantine della rigenerazione naturale si sono impiantate all'esterno del perimetro delle recinzioni esistenti, quindi si sono rese necessarie nuove misure di protezione; 3) le recinzioni esistenti sono state spesso invase da cervi ed è quindi stato necessario sostituirle con recinzioni più alte. Un nuovo sistema di recinzioni è stato progettato e installato per proteggere la rinnovazione naturale su una superficie più ampia e per ingrandire la superficie di area protetta (da 1420 m² a 2144 m²) intorno agli alberi di *A. nebrodensis*. Questa misura permetterà di conservare la biocenosi attorno ad ogni albero e di favorire di conseguenza lo sviluppo della rinnovazione naturale (Fig. 18).



Fig. 18. Recinzioni installate nell'habitat naturale di *A. nebrodensis* per la protezione del popolamento.

Le nuove recinzioni sono fatte di pali di castagno con un diametro superiore non inferiore a 7 cm e una lunghezza non inferiore a 2,40 m. Prima dell'installazione, i pali sono stati calafatati sulla porzione inferiore di 60 cm con catrame freddo e sono stati poi impiantati a 2 m di distanza l'uno dall'altro a 40 cm di profondità nel terreno.

La rete metallica è realizzata in filo di ferro zincato di altezza 1,60 m con una rete degradante, con un peso minimo di 0,70 kg per metro lineare. È stata fissata (mediante filo zincato) su quattro ordini di fili di ferro zincato del diametro di 2,70 mm, che erano ancorati ai pali mediante graffette e posti rispettivamente a livello del suolo, a 1,40 m, a 1,60 m e a 1,90 m dal suolo. Ogni recinzione è dotata di un cancello di 1,5 m di larghezza, costruito secondo lo schema previsto dal progetto come mostrato nella Fig. 19.

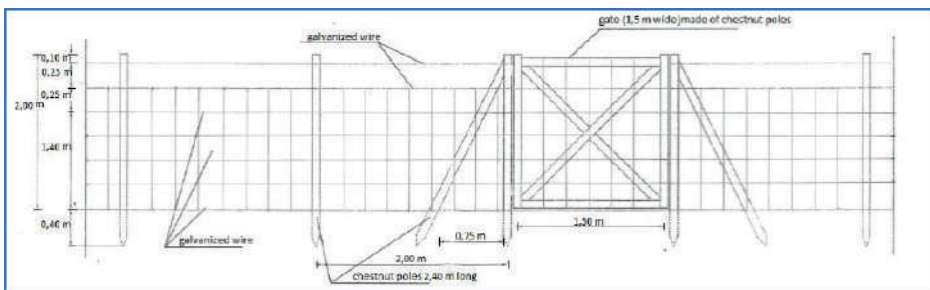


Fig. 19. Progettazione delle recinzioni come riportato nel progetto.

Per l'installazione di recinzioni, sono stati acquistati 1800 pali di castagno, 5000 kg di filo di ferro zincato, 3750 m di rete metallica e 24 giunti in ferro battuto per i cancelli in legno. Sono stati acquistati anche altri prodotti di ferramenta come cerniere e serrature laterali e terra per cancelli. Il perimetro (in metri lineari) delle recinzioni installate intorno ai 30 alberi *A. nebrodensis* è riportato nella tabella 1.

5.5 Misure per la gestione della rinnovazione naturale

Nonostante l'alto tasso di mortalità delle piantine, l'aumento complessivo della rinnovazione naturale di *A. nebrodensis* ha mostrato una graduale espansione nel suo habitat negli ultimi anni. Ad ogni modo l'origine effettiva della rinnovazione naturale, in particolare le piantine e che si trovano a grande distanza dall'albero madre più vicino, può essere valutata solo con le analisi genetiche. Tuttavia, il corretto censimento della rinnovazione naturale e l'aggiornamento della consistenza della popolazione di *A. nebrodensis* hanno permesso di affrontare le scelte di gestione per la conservazione di questa specie. Nell'ambito di questo progetto, l'individuazione e la segnalazione della posizione effettiva di ogni singola accessione è stata di notevole importanza per la gestione della rigenerazione naturale. La rimozione delle vecchie recinzioni e la reinstallazione delle nuove è stata infatti effettuata nel giugno 2021 senza causare danni e interferenze alle piante madri e alle piantine, che non sono facilmente visibili a persone non abituate a cercarle. L'installazione delle nuove recinzioni rafforzerà la protezione alle piantine *A. nebrodensis* e agli alberi adulti. Un ulteriore aumento del numero di piante rigenerate naturalmente è previsto nei prossimi anni.

Capitolo 6

Conservazione ex situ del germoplasma di *A. nebrodensis*

La conservazione ex situ del germoplasma di *Abies nebrodensis* è stata pianificata dal progetto Life4fir per ottenere diversi obiettivi: la creazione di un arboreto clonale, di una banca del seme e di una criobanca. Queste iniziative svolgono un ruolo fondamentale nella conservazione del patrimonio genetico di *A. nebrodensis*.

6.1 Creazione dell'arboreto clonale

La creazione di un arboreto clonale è una delle azioni previste dal progetto Life4fir. Questa iniziativa è intesa non solo come semplice raccolta di germoplasma, ma anche come produzione futura di semi per ottenere una maggiore variabilità genetica, poiché è possibile favorire in questo modo l'incrocio tra i diversi genotipi e produrre semi con una più ampia base genetica.

L'arboreto clonale consentirà inoltre un monitoraggio costante dei singoli genotipi (come il loro accrescimento, la fenologia ecc.), a fini scientifici e didattici. In futuro, quando le piante raggiungeranno la maturità, l'arboreto sarà utilizzato come nuova fonte di produzione di seme della popolazione originaria, evitando gli impatti negativi dovuti alla ripetuta raccolta di seme da piante della popolazione naturale.

Per arrivare alla completa raccolta dei cloni da inserire nell'arboreto clonale, ogni singolo genotipo della popolazione naturale di *A. nebrodensis* dovrà essere propagato vegetativamente.

6.1.1 Propagazione per innesto

Nelle conifere la propagazione vegetativa per la riproduzione di alberi 'plus' selezionati o in via di estinzione, viene effettuata sia per talea che per innesto. Nella propagazione per talea, vengono prelevati porzioni di germogli di circa 10-15 cm e trattati alla base con preparati di talco, contenenti un'auxina (generalmente acido indol-butirrico, IBA), e posti a radicare in un banco nebulizzato.

Questa è una tecnica semplice e spesso efficace, ma purtroppo non è applicabile a tutte le conifere. Prove preliminari condotte in passato avevano già messo in evidenza il basso potenziale rizogeno delle talee di *Abies nebrodensis*. Una valida alternativa è quindi la propagazione per innesto, in cui una parte del germoglio viene innestata su un portainnesto da seme, opportunamente preparato.

L'innesto più utilizzato per le conifere è a 'spacco laterale'. In questo tipo di innesto si prepara una porzione apicale del ramo di circa 10 cm con un taglio della base a "penna" e questa viene inserita in una "tasca" ricavata sul portainnesto, in posizione laterale (Fig. 20a); l'innesto viene quindi opportunamente serrato con un elastico per facilitare il contatto delle parti rigeneranti (regioni cambiali di portainnesto e marza) e il punto innestato viene protetto

dalla disidratazione con un foglio di alluminio (Fig. 20b). Dopo l'innesto, le piante sono mantenute dentro dei sacchetti di plastica (Fig. 20c) fino alla cicatrizzazione dell'innesto (Fig. 20d). Questa tecnica di innesto è stata applicata per la propagazione vegetativa degli alberi di *A. nebrodensis* della popolazione naturale, per la costituzione dell'arboreto clonale, utilizzando marze provenienti da piante adulte.



Fig. 20. Fasi dell'innesto di *Abies nebrodensis*

6.2 Banca del seme

6.2.1 Finalità delle banche del seme

Le banche del seme rappresentano il sistema di conservazione *ex situ* più utilizzato per la conservazione della biodiversità vegetale. Ad oggi sono circa 1750 le banche del seme nel mondo, gestite da Enti pubblici e privati, spesso sotto l'egida delle più importanti organizzazioni di conservazione (come CGIAR, Biodiversity International, CIAT e altre). Il "Secondo rapporto sullo stato delle risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura" (SoWPGR-2) della FAO ha riportato oltre 7.500.000 accessioni conservate con questa tecnica, principalmente riconducibili a cereali e altre specie riprodotte per propagazione vegetativa.

Le banche dei semi operano ad una temperatura di -18°C , conservando i semi all'interno di contenitori di vetro o plastica. Il tempo massimo di conservazione dipende strettamente dalla specie, e può raggiungere spesso molte decine di anni, durante i quali periodicamente vengono ripetuti i test di germinazione e vitalità dei semi.

Relativamente a quanto detto sopra, i semi provenienti dalle 30 piante adulte di *Abies nebrodensis* saranno conservati nella Banca del Seme, istituita presso il MAN (Museo dell'*Abies nebrodensis*) del Comune di Polizzi Generosa.

Per le conifere, e quindi anche per *A. nebrodensis*, la conservazione dei semi a bassa temperatura è un importante e valido sistema di conservazione del germoplasma, ma la grande presenza di semi vuoti, insieme a semi pieni, può rappresentare un problema per la conservazione. Pertanto, in questo progetto è stata applicata l'analisi a raggi X delle singole

partite di semi, per rilevare ed eliminare i semi vuoti.

6.2.2 Selezione di semi pieni

Per selezionare i semi di *Abies nebrodensis* è stata applicata la tecnica dei raggi X, con le modalità descritte di seguito. I semi sono stati puliti e posti in piastre a pozzetti quadrati di plastica (20x20 cm; Fig. 21). Cento (100) semi per trattamento sono stati singolarmente esposti all'analisi a raggi X, con parametri appropriati e selezionati (25 kV, 3 mA, a una distanza di 45 cm dalla sorgente dei raggi X, per 2 min). Dall'analisi delle immagini su lastra, sono stati identificati semi pieni e vuoti: come si evince in Fig. 22, nel seme pieno l'embrione era ben evidente.

Per convalidare questa tecnica, dopo il trattamento ai raggi X, un campione di semi è stato aperto ed il singolo seme è stato osservato allo stereomicroscopio, confermando o meno la presenza di un embrione. In un seme pieno, l'embrione è ben evidente come anche la presenza del suo endosperma.

Per confermare la sopravvivenza dei semi dopo il trattamento ai raggi X, sono stati eseguiti test di germinazione in vitro per valutare la loro vitalità e capacità di germinazione; i risultati hanno mostrato che il 100% dei semi sottoposti a tale trattamento è sopravvissuto. Ciò ha confermato che l'esposizione ai raggi X è un metodo non distruttivo ed efficace per il rilevamento dei semi pieni, quando viene utilizzata una dose appropriata (non letale) di irraggiamento.

Sulla base delle immagini ai raggi X (Fig. 23), i semi vuoti o infestati da insetti o malattie, sono stati rimossi e considerati non validi per la conservazione. Ciò ha permesso di mantenere e implementare la banca del seme (a -18°C) con solo semi pieni e germinabili.



Fig. 21. 100 semi in piastre a pozzetti quadrati

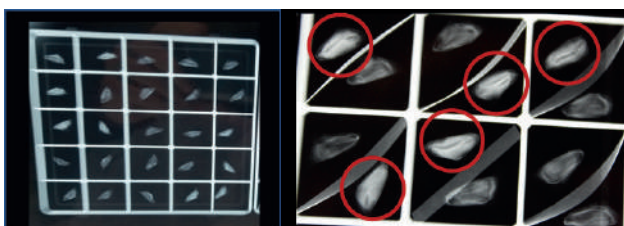


Fig. 22. Semi su pellicola a raggi X (a sinistra); semi pieni (cerchio rosso) e semi vuoti (a destra).

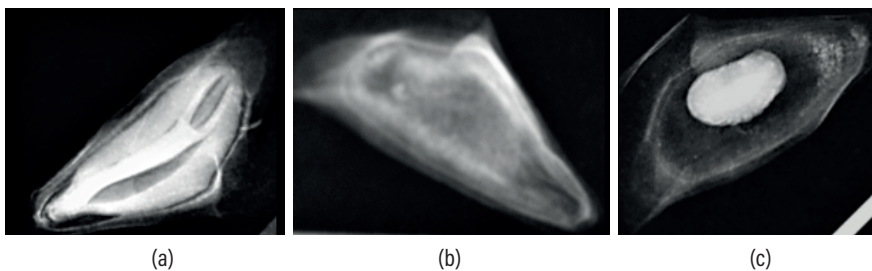


Fig. 23. Seme pieno con embrione (a); seme vuoto (b); seme con larva (c)

6.2.3 Protocollo per la conservazione dei semi a bassa temperatura (-18°C)

I coni maturi sono stati raccolti in ottobre e da questi sono stati prelevati i semi conservati a 4°C per un breve periodo. Dopo l'analisi a raggi X, solo i semi pieni e sani sono stati selezionati per la conservazione.

Prima di essere stoccati, lotti di semi selezionati sono stati sottoposti a test di vitalità, usando il test colorimetrico con i sali di tetrazolio, TTC (Triphenyl Tetrazolio Chloride) e ad un test germinazione in vitro su substrato solido (MS, Murashige and Skoog, privo di ormoni, con 20 g/L di saccarosio e 7 g/L di agar).

Dato che il contenuto di acqua è un fattore critico nel determinare il successo della conservazione dei semi all'interno della banca, il contenuto di acqua dei semi *A. nebrodensis* è stato misurato attraverso un analizzatore di umidità (Moisture Analyzer, Mettler-Toledo), scegliendo solo quelli con valori compresi tra il 6 e l'8%.

I semi, successivamente sono stati pesati e posti in vasetti etichettati contenenti tutte le informazioni necessarie (Fig. 24): ubicazione della banca dei semi; specie; numero identificativo della pianta; anno di raccolta; quantità (gr); numero di semi; data di inizio della conservazione.

Infine i vasetti sono stati conservati in cella freezer (-18°C).



Fig.ure 24. Vaso etichettato con informazioni sul campione di semi e trasferito nella banca dei semi



Fig. 25. Banca dei semi di *A. nebrodensis*

6.2.4 Costituzione della banca del seme di *Abies nebrodensis*

Per la banca del seme, come prima cosa, è stato fondamentale individuare un locale adeguato. Dopo un sopralluogo per verificare l'accessibilità degli spazi definiti, al fine di poter accogliere un numero consistente di visitatori, è stato deciso di collocare la banca dei semi, all'interno del Comune di Polizzi Generosa. La stanza preposta è stata completamente pulita prima dell'arrivo delle attrezzature e sono stati effettuati gli interventi relativi alle norme di sicurezza richieste.

Nella stanza prescelta è stata collocata l'armadio freezer (Fig. 25) per la conservazione a -18°C di semi di piante di *A. nebrodensis*, avente le seguenti caratteristiche:

- due sportelli in vetro trasparente per una facile ispezione del contenuto
- temperatura fino a -20°C per la conservazione dei semi
- ruote e serratura di sicurezza con chiavi
- dotazioni interne: nr. 6 ripiani
- illuminazione interna: a tubi led, con attivazione automatica sia ad ogni apertura della porta che tramite apposito pulsante sul pannello comandi
- pannello comandi: posizionato nella parte superiore della struttura

All'interno dell'armadio freezer (-18°C) sono stati collocati vasetti etichettati con semi pieni di *A. nebrodensis*.

6.3 Criobanca

6.3.1 Finalità delle criobanche

La crioconservazione, ovvero lo stoccaggio a temperature ultra-basse come quella dell'azoto liquido (AL; -196°C), è il metodo più innovativo che consente la conservazione a lungo

termine delle risorse genetiche vegetali. Il metodo preserva organi e tessuti, provenienti da coltura in vitro e/o da campo, mediante un processo di raffreddamento ultraveloce che, se opportunamente sviluppato e ben adattato allo specifica accessione, arresta quasi tutti i processi metabolici nella cellula, preservandone la struttura e la funzionalità biologica. Infatti, alla temperatura dell'azoto liquido pochissime reazioni biologiche e variazioni delle proprietà fisico-chimiche rimangono attive. L'azoto è un gas criogenico che, allo stato liquido, è facilmente reperibile, ha un costo contenuto e trova impiego universalmente nelle criobanche dove assicura il mantenimento di temperature comprese tra -150°C (per i campioni conservati nei vapori del gas) a -196°C (per campioni immersi nella fase liquida di AL).

La totale assenza di subcolture e l'arresto del metabolismo cellulare determinato dalle temperature criogeniche rendono la crioconservazione un metodo sicuro in termini di stabilità genetica del materiale conservato. Ne sono prova i numerosi lavori sperimentali che, in particolare negli ultimi 30 anni, hanno valutato gli aspetti fenotipici, citologici, biochimici e di stabilità molecolare del materiale sottoposto a conservazione in AL senza mai mostrare significative alterazioni stabili.

Relativamente a quanto sopra detto, la crioconservazione rappresenta un'importante opzione supplementare per la conservazione delle risorse genetiche di *Abies nebrodensis*, inoltre nel tempo sono state sviluppate diverse procedure che consentono la conservazione di un pool di organi e tessuti provenienti da colture in vitro o direttamente dal campo. Presso il MAN (Museo dell'*Abies nebrodensis*) nel Comune di Polizzi Generosa è stata istituita una criobanca che conserverà embrioni escissi, polline e campioni di callo embriogenico, questi ultimi inclusi in semi sintetici, dal maggior numero possibile dei 30 alberi di *Abies nebrodensis*.

6.3.2 Costituzione di una criobanca per *Abies nebrodensis*

La stanza della criobanca è stata completamente pulita prima dell'arrivo delle apparecchiature e sono stati effettuati gli interventi relativi alla messa in sicurezza della struttura, nel rispetto delle norme di sicurezza richieste in un ambiente, ove ci sia presenza di azoto liquido.

Per quanto riguarda le norme di sicurezza, la stanza è stata dotata di (i) due rilevatori di ossigeno, posti in punti diametrali della stanza, (ii) una finestra sulla porta di accesso che permette una visione completa dell'interno della stanza quando la porta è chiusa e (iii) corsetto protettivo per il corpo, mascherina e guanti (Fig. 26) da utilizzare durante le operazioni di riempimento del dewar con azoto liquido e durante la manipolazione dei campioni in deposito.

Le caratteristiche salienti del dewar utilizzato per la crioconservazione di *A. nebrodensis* (Locator 8 Plus; Fig. 27) sono le seguenti:

- contenitore per la conservazione dei campioni (dewar) in azoto liquido a -196°C, dotato di monitor di livello a
- capacità 121 litri

- 8 unità rack, con una capacità di 10 scatole per rack e 25 cryovials da 2 mL (provette da conservazione) per scatola
- capacità totale: 2000 cryovials
- velocità di evaporazione statica: 0,6 L/giorno
- diametro collo: 15,2 cm
- dimensioni esterne (diametro x altezza): 55,8 x 95,3 cm
- coperchio con serratura.

Per la fornitura periodica di azoto liquido (ogni due mesi) sono state contattate aziende fornitrici, con sede a Palermo.

Per la gestione della criobanca sarà impiegato personale con competenze adeguate ed opportunamente formato.

La sala sarà allestita con posters che illustrano il progetto LIFE4FIR e le innovative tecniche di conservazione applicate per salvaguardare la specie in via di estinzione.



Fig. 26. Corsetto (a sinistra), mascherina (al centro) e guanti (a destra) per la protezione durante le operazioni con azoto liquido.



Fig. 27. Locator 8 Plus, dewar per la conservazione di campioni in azoto liquido per la criobanca di germoplasma di *Abies nebrodensis* (a sinistra); rack e box in cui sono allocate le cryovials (a destra).

6.3.3 Protocolli di crioconservazione per *Abies nebrodensis*

Protocollo per la crioconservazione del polline

Le antere mature sono state raccolte dagli alberi di *A. nebrodensis* nel mese di maggio. Dopo la rimozione dalle antere, i granuli di polline raccolti sono stati setacciati ed è stata effettuata anche una caratterizzazione morfologica mediante stereomicroscopio, microscopio ottico e microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM); tale caratterizzazione ha mostrato che i granuli pollinici di *A. nebrodensis* sono isodiametrici con un corpo centrale ellittico e con due sacche d'aria laterali (bisaccati) e un leptoma. Le sacche d'aria sono chiaramente sporgenti dal corpo.

Il contenuto di umidità del polline (campione di circa 0,2 gr) è stato misurato con un Moisture Analyzer (Mettler-Toledo). Per la crioconservazione del polline non è stato necessario alcun processo di essiccazione, poiché il contenuto di acqua dell' 8-10% adeguato per la crioconservazione viene raggiunto dopo tre giorni di conservazione del polline a 4°C. I campioni di polline sono stati trasferiti in cryovials e immersi direttamente in azoto liquido (-196°C), per la conservazione. Per la validazione del protocollo di crioconservazione, i campioni sono stati scongelati e sottoposti a test di vitalità come riportato di seguito. Le cryovials contenenti polline sono state scongelate sotto una cappa a flusso laminare per 2 ore a temperatura ambiente.

Il polline, prima e dopo la crioconservazione, è stato sottoposto ad un controllo della vitalità, tramite il test del tetrazolio cloruro (TTC test) e della germinabilità in vitro su substrato solido. Per effettuare il test TTC, sono state fatte cadere due gocce di soluzione TTC all'1% (200 mg di 2, 3, 5 trifetil tetrazolio cloruro e 12 g di saccarosio in 20 ml di acqua distillata) su granuli pollinici posti in un vetrino da microscopio, successivamente coperto con un vetrino copri oggetto. Dopo 24-48 h di incubazione al buio, è stata effettuata un'osservazione al microscopio e sono stati considerati vitali i granuli di polline colorati di arancione o rosso brillante (Fig. 28). La germinazione in vitro del polline crioconservato è stata testata su un substrato solido composto da acido borico (50 mg/L), saccarosio (15 g/L) e agar vegetale (6 g/L) a 25°C e dopo incubazione di 24-48 h, il polline è stato osservato al microscopio. Il granulo pollinico è stato considerato germinato quando la lunghezza del tubo pollinico era almeno 3 volte il diametro del granulo (Fig. 29).

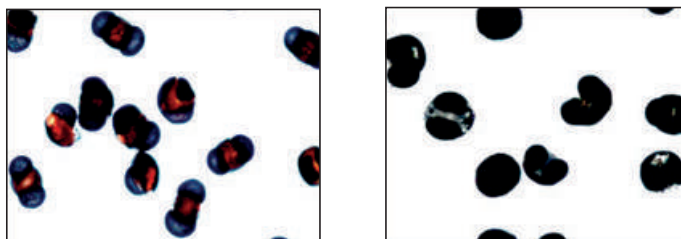


Fig. 28. Test TTC - Granuli di polline vitale (a sinistra), non vitale (a destra)

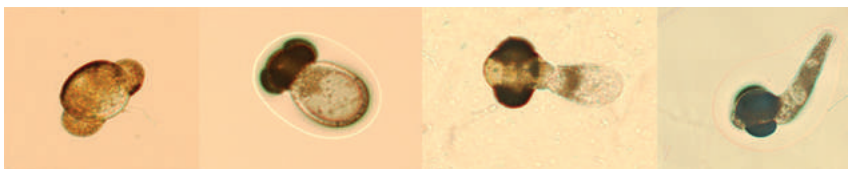


Fig. 29. Germinazione in vitro di polline su terreno solido: sviluppo del tubetto polline

6.3.4 Protocollo per la crioconservazione di embrioni zigotici

I coni degli alberi di *Abies* sono stati raccolti in ottobre e poi conservati in ambiente controllato. I semi maturi sono stati puliti e mantenuti a 4°C per un breve periodo. I semi maturi sono stati lavati sotto acqua corrente, disinfettati prima con etanolo (70%, 1 min), poi con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% contenente alcune gocce del tensioattivo Tween (20 min) ed infine risciacquati in acqua distillata sterile. Successivamente, i semi sono stati immersi in acqua per 48 ore in condizioni sterili e aperti sotto cappa a flusso laminare per estrarre gli embrioni zigotici (Fig. 30).

Il contenuto di umidità degli embrioni essicci è stato determinato dallo strumento Moisture Analyzer, rilevando un valore inferiore al 10%, un livello ottimale di umidità prima dell'immersione in azoto liquido.

Gli embrioni essicci sono stati inseriti in cryovials, trattati con la soluzione criogenica Plant Vitrification Solution 2 (PVS2: 30% glicerolo, 15% glicole etilenico, 15% dimetilsolfossido (DMSO) in MS, 0,4 M di saccarosio) e trasferiti in cryobox prima dell'immersione in azoto liquido a -196°C. Come controllo è stato usato un lotto di embrioni essicci non trattati con la soluzione vitrificante (-PVS2).

Tutte le cryovials, dopo lo scongelamento in bagno termostato (1 min a 40 °C), sono state poste sotto cappa a flusso laminare, la soluzione di PVS2 è stata rimossa e sostituita con una soluzione di lavaggio (Murashige e Skoog (MS) liquido con 1,2 M di saccarosio), per 20 min. Per convalidare il protocollo, sono stati applicati i test TTC e di germinazione in vitro su gli embrioni zigotici crioconservati per stimarne la vitalità e la germinazione. In pratica, gli embrioni zigotici sono stati completamente immersi in TTC (0,1% p/v) per 24 h al buio a 30°C. Successivamente, sono stati lavati con acqua distillata. Lo sviluppo del colore rosso ha indicato la vitalità dell'embrione zigotico. La germinazione in vitro è stata effettuata mantenendo in coltura in vitro gli embrioni crioconservati su un substrato Murashige e Skoog (MS) privo di ormoni.

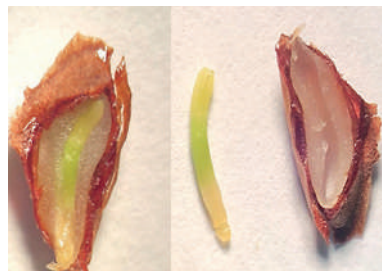


Fig. 30. Seme maturo sterilizzato con embrione (a sinistra),
embrione essiccato (a destra)

6.3.5 Protocollo per lo sviluppo di linee di callo embriogeniche e loro crioconservazione.

Linee di callo embriogenico di *Abies nebrodensis*, sono state ottenute tramite induzione da embrioni zigotici maturi. Gli embrioni sono stati escissi da semi maturi raccolti nell'ottobre 2020 da piante adulte con il seguente numero di identificazione (ID): 6, 7, 8, 10, 12, 13, 19, 21, 22, 27 e collocati orizzontalmente in piastre Petri.

Sono stati testati tre substrati di coltura: in particolare il substrato SH (Schenk e Hildebrandt, 1972) addizionato con tre diverse concentrazioni di auxina e citochinina. Il callo embriogenico (Fig. 31) è stato ottenuto, per la prima volta in questa specie, solo in substrato SH con una citochinina (BAP, 1 mg/L). Dopo 8-12 settimane su un substrato di induzione al buio, il callo sviluppato dal singolo embrione è stato separato dall'embrione e trasferito in un substrato fresco per la proliferazione, trattando ogni callo come singola linea cellulare. Il substrato di proliferazione era lo stesso usato nella fase di induzione.

Il tessuto embriogenico (ET) è stato mantenuto al buio a 25 °C e sottoposto a subcoltura su substrato fresco ogni 15 giorni. Quando si è sviluppata una quantità sufficiente di ET, le singole linee cellulari sono state trasferite su un substrato di maturazione (SH con acido abscissico 10 mg/L, polietilenglicole 8%, e maltosio 40%). Le colture sono state mantenute a 25 °C, al buio, effettuando le subcolture ogni 2 settimane. La formazione di ET è stata continuamente osservata allo stereomicroscopio, insieme allo sviluppo degli embrioni somatici. La tecnica di incapsulamento/vitrificazione (Fig. 32) è stata applicata per la crioconservazione delle linee di callo embriogenico. Il protocollo consiste nell'incapsulamento, in alginato di sodio, delle porzioni di callo, e nel successivo trattamento con la soluzione "Plant Vittrification Solution 2".

I propaguli di callo così rivestiti hanno mostrato la capacità di proliferare dopo il processo di incapsulamento.

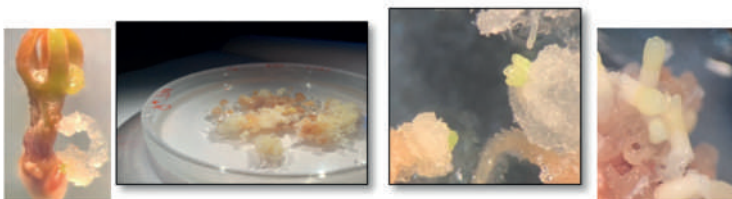


Fig. 31. Induzione e sviluppo di linee di callo embriogenico



Fig. 32 Tecnica di incapsulamento/vitrificazione per la crioconservazione delle linee embriogeniche.

Capitolo 7

Ripopolamento in nuclei di re-diffusione con piantine selezionate

Nell'ambito del progetto LIFE4FIR l'azione C6 è mirata alla realizzazione di nuclei di ripopolamento di *A. nebrodensis* impiegando le piantine selezionate ottenute dagli incroci controllati, allevate nel vivaio 'Piano Noce' di Polizzi Generosa.

Al fine di ottenere risultati ottimali, la scelta delle aree su cui effettuare la piantumazione, ha tenuto conto anche dei risultati ottenuti con le parcelle sperimentali realizzate tra il 2001 e il 2005 con il Progetto LIFE2000NAT/IT/7228 "Conservazione in situ ed ex situ di *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei". Sopralluoghi effettuati nel territorio del Parco delle Madonie hanno permesso di individuare le aree che presentano condizioni ecologico-ambientali adeguate, anche in base alle indicazioni fornite dai risultati dei precedenti rimboschimenti di *A. nebrodensis*.

Complessivamente sono stati individuati dieci siti nel territorio delle Madonie, distribuiti all'interno dei territori dei comuni di Polizzi Generosa, Isnello, Petralia Soprana, Petralia Sottana, Geraci Siculo e Gratteri (Tab. 5 e Fig. 33). Tutte le parcelle ricadono nel perimetro del Parco delle Madonie all'interno di aree gestite dal Dipartimento dello Sviluppo Agricolo e Territoriale.

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°48'55.52N	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
Savocheffa	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

Tabella 5 - Localizzazione delle parcelle individuate nel territorio delle Parco delle Madonie

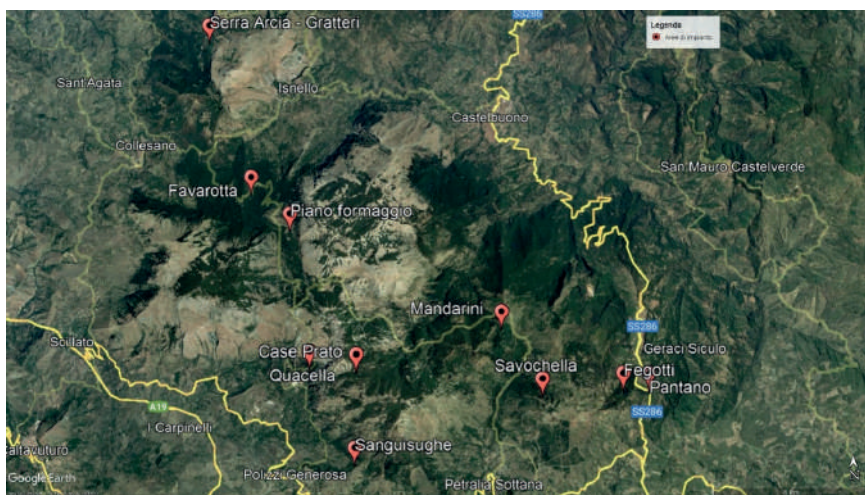


Fig. 33 Ubicazione in mappa delle parcelle di rimboscimento nel Parco delle Madonie.

7.1 Caratteristiche della vegetazione delle aree selezionate

Le parcelle si trovano principalmente in stazioni comprese nella fascia altimetrica localizzata tra i 1100 e 1.600 m s.l.m., caratterizzate prevalentemente dalle formazioni caducifoglie mesofile afferenti al *Quercion ilicis*, *Quercion roboris* e al *Geranio versicoloris* - *Fagion*. Solo due parcelle ricadono a quote più basse, tra 750 e 850 m, in aree con caratteristiche microclimatiche potenzialmente favorevoli alla crescita delle piantine di *A. nebrodensis* da mettere a dimora.

Le parcelle da realizzare a quote comprese tra 1100 e 1400 m rientrano nell'ambito della vegetazione ascrivibile all'*Ilici aquifolii-Quercetum austrotyrrhenicae*, un'associazione forestale di tipo relittuale e di notevole interesse geobotanico, insediata su quarzareniti del *Flysch Numidico*. Questi boschi comprendono specie quali *Quercus petraea* subsp. *austrotyrrhenica* cui si associano *Acer obtusatum*, *A. campestre* e, marginalmente, *A. monspessulanum*, *Sorbus torminalis* e *Ulmus glabra*. Nei tratti più freschi e alle quote più elevate sono presenti anche specie della fascia soprastante come *Fagus sylvatica* e *Acer pseudoplatanus*. Il piano dominato è costituito in prevalenza da *Ilex aquifolium* che trova in questa cenosi le condizioni ottimali di crescita, formando un denso ed intricato sottobosco interrotto soltanto da individui di *Malus sylvestris*, *Crataegus orientalis* subsp. *orientalis*, *Prunus spinosa*, *Euonymus europaeus*, *Daphne laureola*, *Rhamnus catharticus* e *Ruscus aculeatus*. Tra le entità erbacee, oltre ad *Aquilegia vulgaris*, si ricordano alcune specie di interesse fitogeografico come, *Anemone apennina*, *Cyclamen repandum*, *C. hederifolium*, *Dactylorhiza romana*, *Hieracium racemosum* subsp. *pignattianum*, *Drymochloa drymeia*, *Lathyrus venetus*, *Primula acaulis*, *Symphytum gussonei*, *Viola reichenbachiana*.

Le parcelle da realizzare nelle quote superiori ai 1400 m s.l.m. rientrano nell'ambito dei boschi di faggio e afferenti al *Geranio versicoloris-Fagion*. Lo strato arboreo di questi

boschi è dominato da *Fagus sylvatica* cui si associano spesso individui invecchiati di *Acer pseudoplatanus*. Nello strato arbustivo, oltre al faggio, si rinvencono *Sorbus graeca*, *Orthilia secunda* subsp. *secunda*, *Euphorbia meuselii* e, sporadicamente, *Rhamnus catharticus* ed *Ilex aquifolium*. Nei tratti più aperti si riscontrano anche *Astragalus nebrodensis*, *Crataegus laciniata*, *Prunus mahaleb* subsp. *cupaniana* e *Rosa sicula*. Lo strato erbaceo presenta poche specie fra le quali assumono maggiore frequenza *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* e *Hieracium racemosum* subsp. *pignattianum*. Alcune parcelle previste a quote poste tra 800 e 1200 m slm (Quacella, Piano Formaggio, Favarotta), anche se costituite da substrato calcareo, presentano suolo profondo e decalcificato in superficie. Potenzialmente esse sono interessate da aspetti vegetazionali riferibili al bosco di leccio mesofilo (*Aceri campestris*-*Quercetum ilicis*), associazione caratterizzata dalla presenza di *Ilex aquifolium* e di alcune specie arboree caducifoglie quali *Acer campestre*, *A. monspessulanum*, *Sorbus greca*, *Malus sylvestris* e di querce afferenti al ciclo di *Quercus pubescens* s. l. Nello strato arbustivo Fig.no, oltre alle ricordate specie, molti taxa come *Euphorbia characias*, *Fraxinus ornus*, *Lonicera etrusca*, *Pyrus amygdaliformis*, *Rubia peregrina*, *Rosa sempervirens*, *Ruscus aculeatus*, *Clematis vitalba*, *Daphne laureola* e *Tamus communis*. Lo strato erbaceo annovera, tra gli altri, *Brachypodium sylvaticum*, *Cyclamen hederifolium*, *C. repandum*, *Lamium flexuosum*, *Asplenium onopteris*, *Thalictrum calabricum*, *Trifolium pratense*, *Viola dehnhardtii*, *Paeonia mascula* subsp. *mascula*. Una parcella prevista a circa 750 m di quota (Serra Arcia) trova giustificazione nella considerazione che *A. nebrodensis* in passato era localizzato a quote più basse rispetto a quelle in cui vive attualmente la residua popolazione naturale e che, a causa dell'azione antropica, ha finito per occupare ambiti meno accessibili localizzati a quote comprese tra 1400 e 1600 m slm.

7.2 Tecniche di piantumazione

La messa a dimora delle piantine di *Abies nebrodensis* nelle singole parcelle verrà eseguita tenendo conto dei risultati ottenuti dal precedente progetto LIFE.

L'impianto dovrà essere fatto tenendo conto delle curve di livello e dell'esposizione del sito.

Le singole parcelle, tenuto conto degli obiettivi del progetto Life, avranno una superficie compresa tra 3000 e 4000 m² e il numero di piante che verranno messe a dimora è pari a 400, posizionate in modo che abbiano spazio per crescere senza arrecare danno alle eventuali specie rare e/ o endemiche presenti.

In ogni singola parcella sarà eseguita una recinzione, apertura delle buche, messa a dimora di leguminose arbustive, messa a dimora di piantine e semi di *Abies nebrodensis*.

7.3 Recinzione

La recinzione sarà effettuata lungo il perimetro dell'area con pali di castagno del diametro di 8-10 cm lunghi 2,40 m inseriti nel suolo per circa 40 cm e posti ad una distanza di 2 m l'uno dall'altro (Fig. 34). L'altezza fuori terra sarà di circa 2 m. Sui pali saranno fissati 4 ordini di filo zincato collegati ad una rete metallica a maglie progressiva avente un'altezza di 1,65 m e un sovrastante ordine di filo. L'accesso alle parcelle sarà garantito dalla realizzazione di cancelli di larghezza 1,5 m ed una altezza di circa 1,80 m (Fig. 35).



Fig. 34. Installazione delle recinzioni



Fig. 35. Posizionamento del cancello

7.4 Apertura delle buche

L'apertura delle buche sarà effettuata sia con ausili meccanici a scoppio che con attrezzature agricole specifiche. Le buche, distanziate una dall'altra di circa 3-4 metri, saranno realizzate in funzione delle caratteristiche del sito. Al fine di assicurare alle giovani piantine di *Abies nebrodensis* uno sviluppo armonico dell'apparato radicale, una maggiore riserva idrica e il mantenimento della stessa durante la stagione estiva, le buche saranno di forma tronco-conica e piramidale.

Le prime avranno un diametro inferiore di circa 80 cm e un diametro superiore di circa 50 cm con profondità compresa tra 50 e 60 cm (Fig. 36a). Le buche piramidali avranno invece il lato inferiore di 80 cm, quello superiore di 50 cm, mentre l'altezza sarà di circa 60 cm (Fig. 36b).

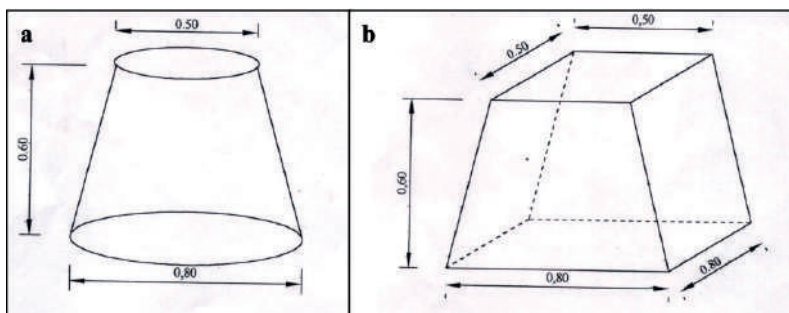


Fig. 36. a) Schema della buca tronco-conica; b) buca piramidale

7.5 Piantazione di leguminose arbustive

La messa a dimora di specie arbustive, afferenti alle famiglie delle Fabaceae, ha come obiettivo quello di migliorare la fertilità del suolo ed assicurare alle piantine di *Abies nebrodensis* protezione dal caldo e siccità estiva. Gli arbusti che verranno utilizzati sono appartenenti ai generi *Genista*, *Spartium* e *Cytisus* ed avranno un'età compresa fra i 2 e i 3 anni.

Questi verranno piantati in prossimità delle piantine di *Abies* ad una distanza di circa 50 cm contribuendo a mantenere un microclima idoneo allo sviluppo delle piantine nel periodo primaverile-estivo e a proteggerle dai forti venti. Per ogni singola piantina di abete verranno piantumati in genere due arbusti.

7.6 Piantazione e semina di *A. nebrodensis*

Le piantine utilizzate nei rimboschimenti derivano dagli incroci controllati realizzati tra individui di *A. nebrodensis* in base alla loro distanza genetica. I semenzali sono stati trapiantati in fitocelle rigide (9x9x20 cm) in vivaio dopo un anno e sottoposte a micorrizzazione. Le 400 piantine da mettere a dimora avranno un'età di circa 3 anni (1+2) e saranno posizionate nelle diverse parcelle secondo uno schema tendenzialmente a quinconce. Durante la piantumazione sarà aggiunto nella buca del concime biologico ricco di fosforo al fine di limitare lo shock dovuto al trapianto. Successivamente, verrà realizzata una conca attorno ad ogni singola piantina e la pacciamatura nel periodo primaverile, per favorire la formazione di una adeguata riserva idrica ed evitare l'evaporazione dell'acqua.

La semina diretta di *A. nebrodensis* verrà anche eseguita posizionando i semi direttamente all'interno di circa 50 buche (5 semi per buca), delle dimensioni 40x40x40 cm, a circa 3 cm di profondità.

AUTORI

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

BIBLIOGRAFIA

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.





BENEFICIARI DI LIFE4FIR



ISBN 979-12-210-3204-8



9 791221 032048