



CENTRO ITALIANO DI STUDI E DI DOCUMENTAZIONE  
SUGLI ABETI MEDITERRANEI

PNR "RIVIERA DI ULISSE"

---

**ANALISI DELLA STRUTTURA GENETICA DELLA POPOLAZIONE  
LOCALE DI *PINUS HALEPENSIS* NELL'AMBITO DEL PROGETTO -  
BANCA DEL GERMOPLASMA DEL PINO D'ALEPPO (*PINUS  
HALEPENSIS*) NEL S.I.C. GIANOLA E M. DI SCAURI (IT6040023)**



**PRIMI RISULTATI**

**AGOSTO 2008**

## SOMMARIO

<b>1</b>	<b>METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO.....</b>	<b>3</b>
1.1	SCHEDE ALBERI CAMPIONATI .....	3
<b>2</b>	<b>METODOLOGIE DI ANALISI .....</b>	<b>52</b>
2.1	ESTRAZIONE DEL DNA.....	54
2.2	DETERMINAZIONE DELLA QUANTITÀ E DELLA QUALITÀ DEL DNA ESTRATTO .....	55
2.3	ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA .....	58
2.4	ANALISI GENETICHE .....	61
<b>3</b>	<b>GRUPPO DI LAVORO .....</b>	<b>64</b>

## 1 METODOLOGIE DI CAMPIONAMENTO

Il prelevamento in campagna dei campioni di foglie aghiformi di *Pinus halepensis*, è stato effettuato tra Ottobre e Dicembre 2007. Per ogni stazione sono stati campionati 5 o più individui per popolamento, numeri necessari a rendere esaustivi i risultati dell'analisi genetica.



**Figura 1 - fronde di Pino d'Aleppo campionati**

Le stazioni ritenute più interessanti e di seguito campionate per le analisi genetiche, hanno riguardato i promontori della Grotta di Tiberio, Punta Cetarola – Torre Capovento, Monte Orlando e il promontorio di Gianola, tutti i siti rientrano nel Parco Regionale Riviera di Ulisse.

La scelta dei siti ove effettuare il campionamento, è ricaduta nelle stazioni considerate “indicative” ai fini della conservazione della specie, data la scarsa presenza di insediamenti umani (urbanizzazioni e aree a sviluppo agricolo). La scelta dei suddetti siti è prevalentemente caratterizzata da presenza di *Pinus halepensis* in stazioni, che per ragioni topografiche, hanno mantenuto un “carattere originario” delle popolazioni locali di *P.halepensis* e che in ogni caso risultano essere isolate dal contesto delle altre pinete d'Aleppo presenti nell'area (tra cui annoveriamo anche tutte quelle artificiali per recenti piantumazioni). La scelta è totalmente ricaduta sulle aree rupicole e/o falesie a mare che hanno mantenuto un certo grado di isolamento, dal contesto del territorio retrostante ampiamente antropizzato.

### 1.1 Schede alberi campionati

Per ogni pianta campionata è stata dedicata un'apposita scheda di campionamento, contenete tutti i dati stazionali della specie (quota, esposizione, pendenza del terreno, coordinate geografiche GPS, alcune caratteristiche dell'individuo, caratteristiche del suolo e foto), da cui sono stati prelevati i campioni per le analisi genetiche.

• **CAMPIONAMENTO SUL PROMONTORIO DI GIANOLA**

SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 1 (Camp. 1)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

**Dati stazionali**

quota  
m 69

**pendenza**

0 - 10°

10° - 20°

20° - 30°

> 30°

**esposizione**

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

**GPS**

punto o coordinate

**LAT 41°25'11,14 "**

**LONG 13°69'31,94 "**

**Caratteristiche individuo**

**diámetro**

max (cm) 30

min (cm) 25

**altezza**

TOTALE (m) 8

fusto libero (m) 2

**fisionomia**

monumentale

adulto

**giovane**

senescente

**rigenerazione**

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

**chioma**

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico

**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

**avversità**

insetti \_\_\_\_\_

funghi \_\_\_\_\_

incendi \_\_\_\_\_

epifite \_\_\_\_\_

**posizione**

isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_

giardino ( ) privato ( ) parco pubblico

in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria

siepe agricola di confine

in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}

ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }

a prevalenza di \_\_\_\_\_

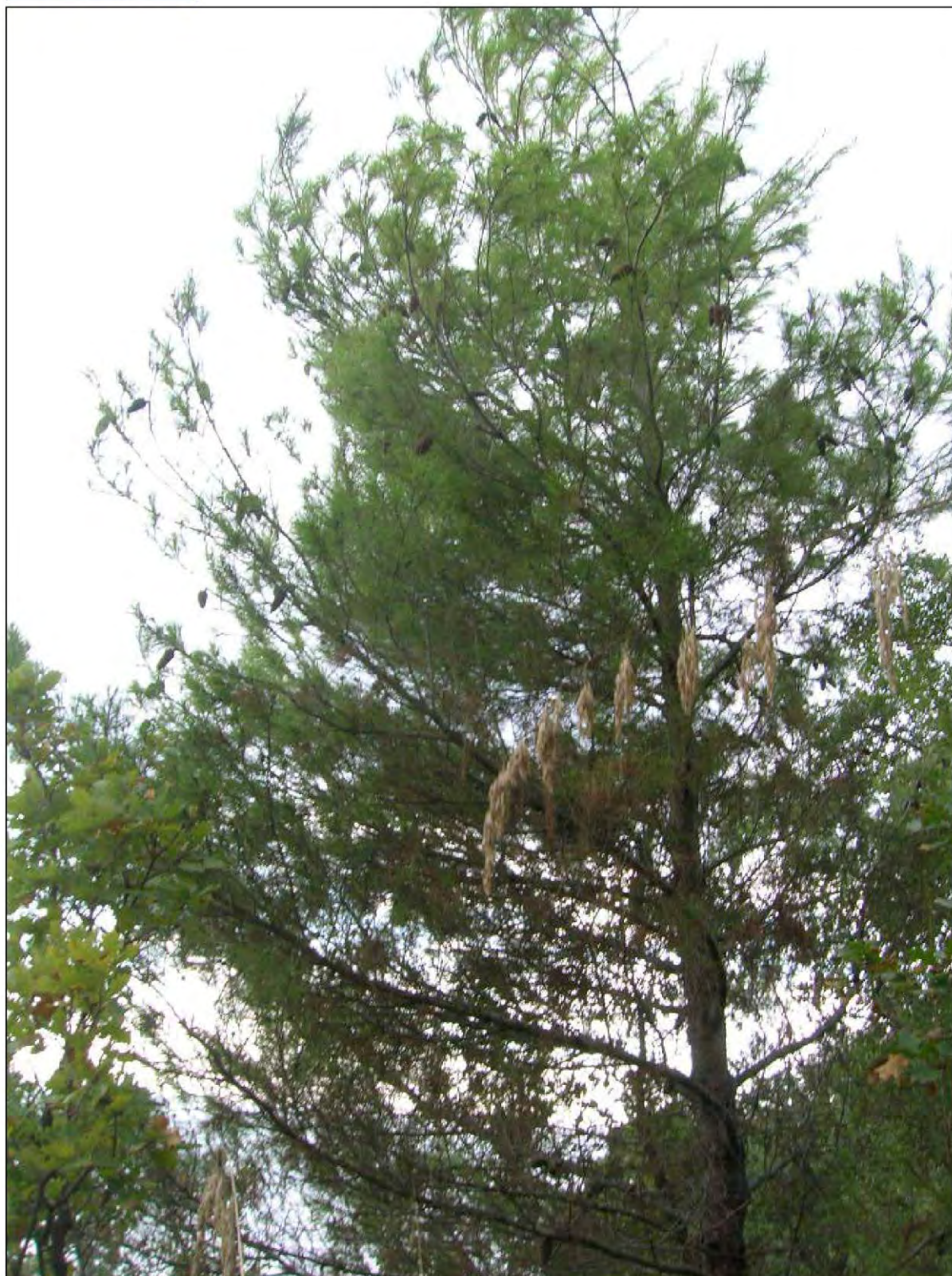
**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda di affiorante di matrice conglomeratica**

CISDAM (Centro Italiano di Studi e di Documentazione sugli Abeti Mediterranei)  
 Via S. Liberata, 1 - 66040 Rosello (CH) Italia.  
 Tel. e Fax: (0039) 0872-948444. E-Mail: cisdam@tin.it

4

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **2 (Camp. 2)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

## Dati stazionali

quota

m **60**

pendenza

- [ ] 0 - 10°  
 [ ] 10° - 20°  
 [x] 20° - 30°  
 [ ] > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°24'98,84 ''**  
**LONG 13°69'28,43''**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **40**  
 min (cm) **35**

altezza

TOTALE (m) **8**  
 fusto libero (m) **2**

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

fisionomia

- monumentale  
 **X adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 **X incendi recente**  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **3 (Camp. 3)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

## Dati stazionali

quota

m **70**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
<b>O</b>	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°24'88,01 "**  
**LONG 13°69'09,04"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **25**  
 min (cm) **20**

altezza

TOTALE (m) **5**  
 fusto libero (m) **1**

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 **incendi recente**  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

Caratteristiche suolo: **scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**



Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **4 (Camp. 4)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

## Dati stazionali

quota

m **66**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°24'69,87 "**  
**LONG 13°68'81,14"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **35**  
 min (cm) **30**

altezza

TOTALE (m) **6**  
 fusto libero (m) **1,5**

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **5 (Camp. 5)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

## Dati stazionali

quota

m **60**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°24'66,86 "**  
**LONG 13°68'71,71"**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **35**  
 min (cm) **30**

altezza

TOTALE (m) **8**  
 fusto libero (m) **2**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 6 (Camp. 6)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

## Dati stazionali

quota

m 54

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°24'58,24''**  
**LONG 13°68'48,64''**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) 35  
 min (cm) 30

altezza

TOTALE (m) 8  
 fusto libero (m) 2

rigenerazione

Gamica  Agamica

Rinnovazione affermata?

Si  No

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  normale  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  normale  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**

Foto di riferimento



## SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 7 (Camp. 7)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

### Dati stazionali

quota

m 47

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

LAT 41°24'58,00"  
 LONG 13°68'33,66"

### Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) 20  
 min (cm) 15

altezza

TOTALE (m) 4  
 fusto libero (m) 0,5

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica



Foto di riferimento



## SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 8 (Camp. 8)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Formia - Minturno** Località **Promontorio di Gianola**

### Dati stazionali

quota

m 44

pendenza

- [ ] 0 - 10°  
 [x] 10° - 20°  
 [ ] 20° - 30°  
 [ ] > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

LAT 41°24'53,08"  
 LONG 13°68'37,80"

### Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) 20  
 min (cm) 15

altezza

TOTALE (m) 3  
 fusto libero (m) 0,5

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico (max 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice conglomeratica**

Foto di riferimento



• **CAMPIONAMENTO SUL MONTE ORLANDO**

SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 1 (Camp. 1)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Gaeta** Località **Monte Orlando**

**Dati stazionali**

quota  
m **109**

pendenza

0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°20'46,25"**

**LONG 13°57'21,61"**

**Caratteristiche individuo**

diametro

max (cm) **45**  
 min (cm) **40**

altezza

TOTALE (m) **10**  
 fusto libero (m) **4**

fisionomia

monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico

**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

CISDAM (Centro Italiano di Studi e di Documentazione sugli Abeti Mediterranei)  
 Via S. Liberata, 1 - 66040 Rosello (CH) Italia.  
 Tel. e Fax: (0039) 0872-948444. E-Mail: cisdam@tin.it

20

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 2 (Camp. 2)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Gaeta** Località **Monte Orlando**

## Dati stazionali

quota

m **108**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°20'46,92"**  
**LONG 13°57'24,18"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **35**  
 min (cm) **30**

altezza

TOTALE (m) **8**  
 fusto libero (m) **3**

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

fisionomia

- monumentale  
 **X adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  **X normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **X normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

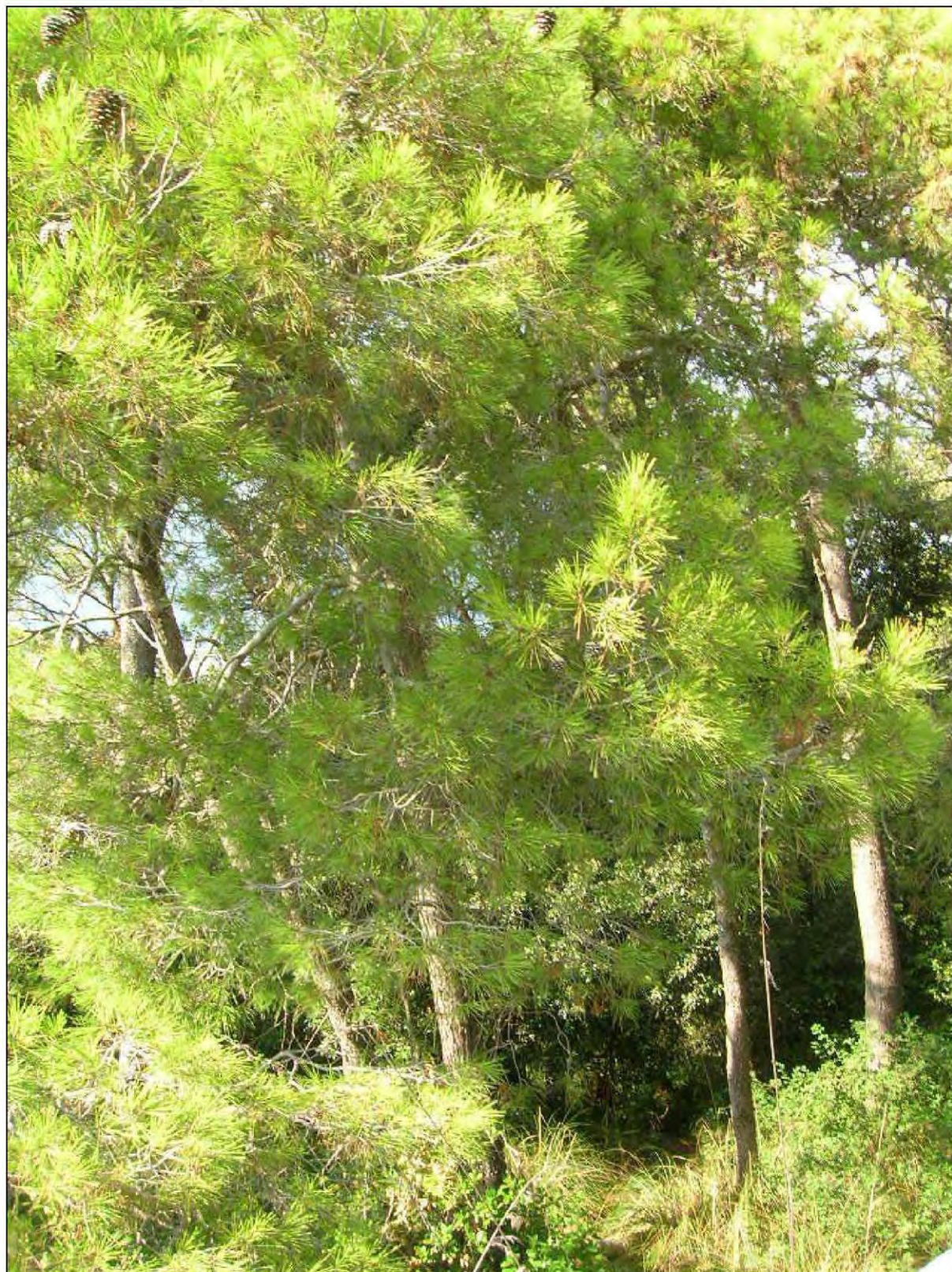
posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico (max 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione 3 (Camp. 3)

Data 11 / 10 / 2007

Operatore: Associazione CISDAM

Comune: **Gaeta** Località **Monte Orlando**

## Dati stazionali

quota

m 100

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate  
**LAT 41°20'48,52"**  
**LONG 13°57'19,22"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) 45  
 min (cm) 40

altezza

TOTALE (m) 10  
 fusto libero (m) 4

rigenerazione

Gamica  Agamica

Rinnovazione affermata?

Si  No

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  normale  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  normale  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

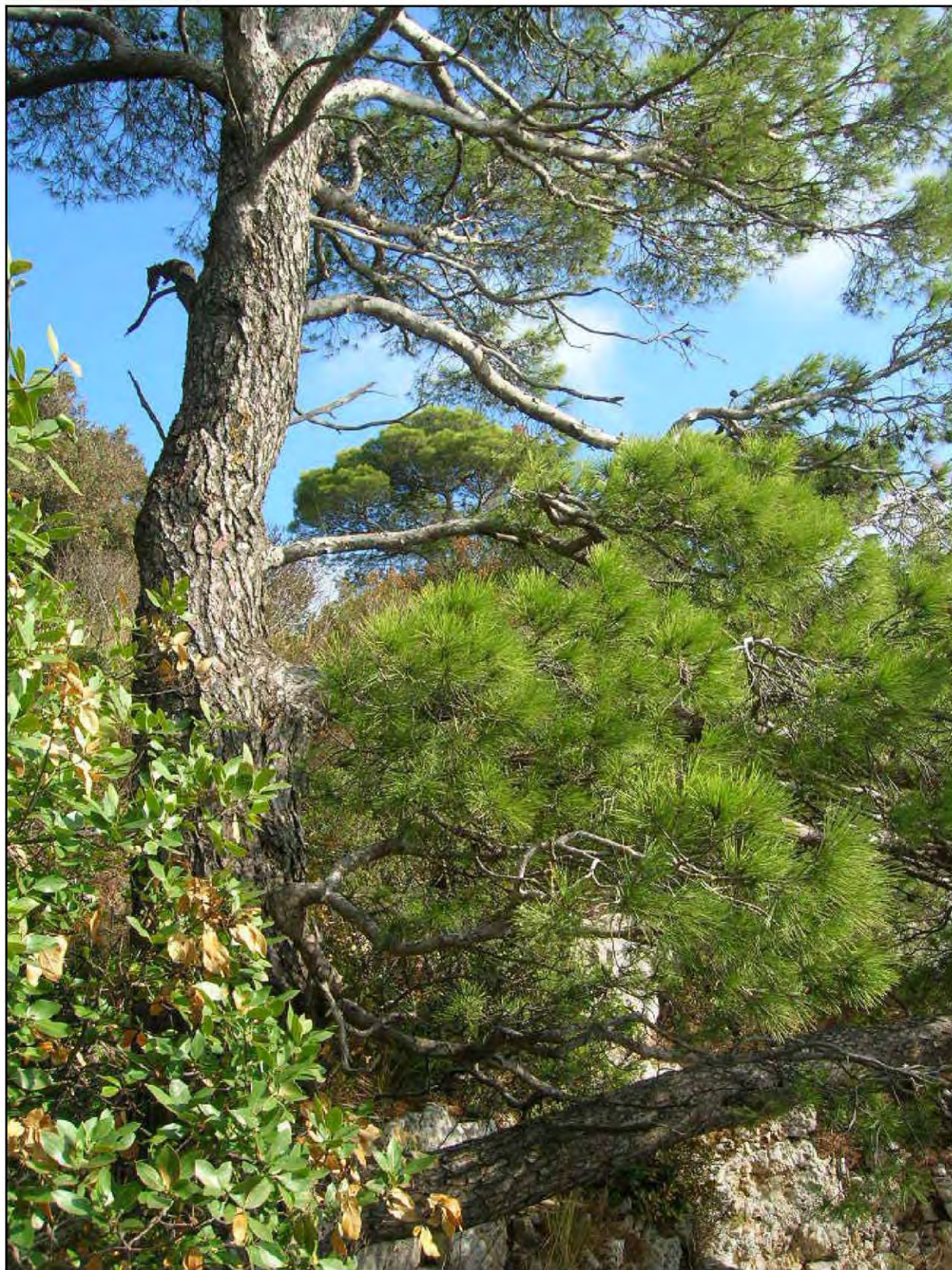
- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**



Foto di riferimento



## SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **4 (Camp. 4)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Gaeta** Località **Monte Orlando**

### Dati stazionali

quota

m **91**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°20'46,87"**  
**LONG 13°57'12,63"**

### Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **45**  
 min (cm) **40**

altezza

TOTALE (m) **6**  
 fusto libero (m) **3**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

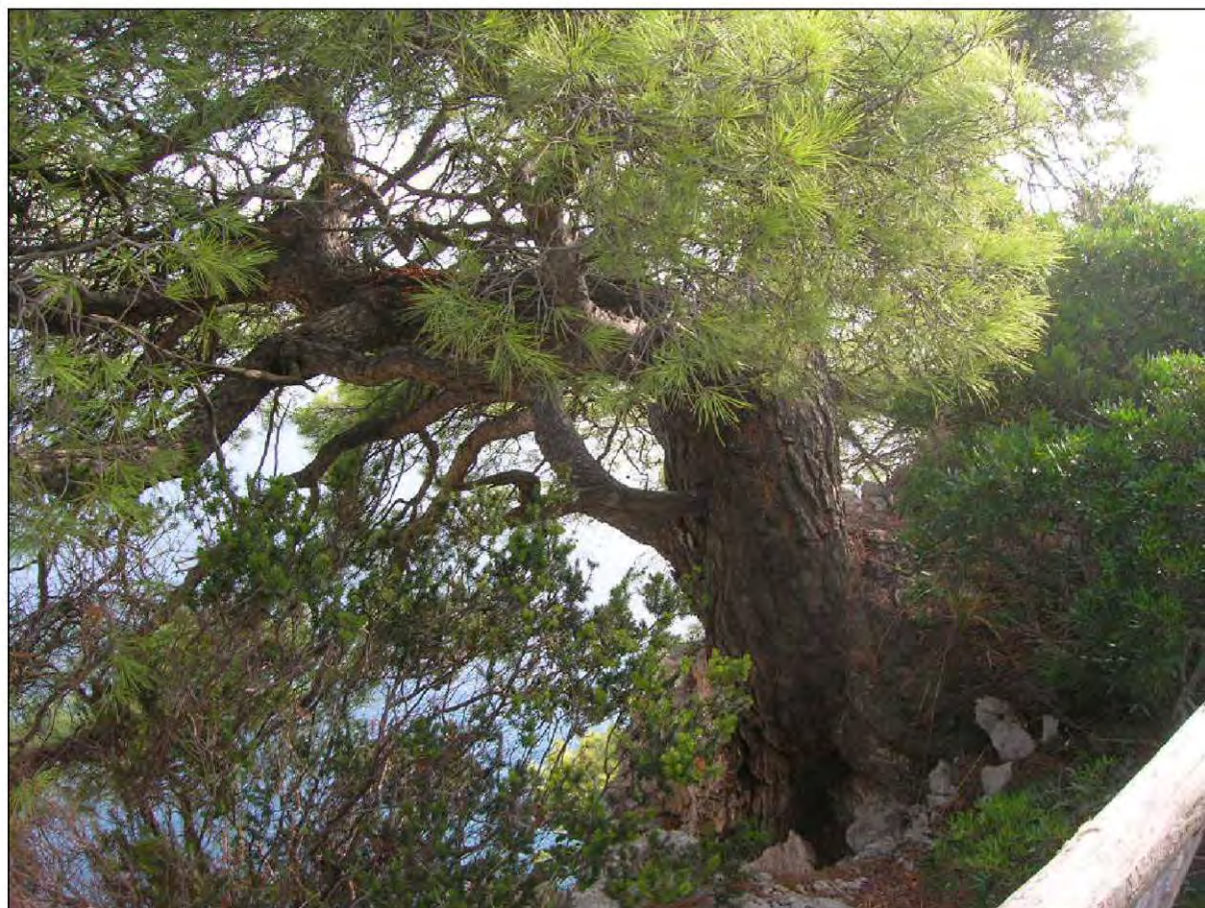
posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **5 (Camp. 5)**

Data **11 / 10 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Gaeta** Località **Monte Orlando**

## Dati stazionali

quota

m **86**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°20'46,48"**  
**LONG 13°57'10,30"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **40**  
 min (cm) **35**

altezza

TOTALE (m) **6**  
 fusto libero (m) **3**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



• **CAMPIONAMENTO SU PUNTA CETAROLA**

SCHEMA DI RILEVAMENTO

N° campione **1 (Camp. 1)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Centarola**

**Dati stazionali**  

quota  
 m **45**

**pendenza**  
 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

**esposizione**  

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

**GPS**  
 punto o coordinate  
**LAT 41°23'87,51"**  
**LONG 13°47'30,31"**

**Caratteristiche individuo**

**diametro**  
 max (cm) **45**  
 min (cm) **50**

**altezza**  
 TOTALE (m) **8**  
 fusto libero (m) **3**

**fisionomia**  
 monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

**rigenerazione**  
 **Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?  
 **Si**  No

**chioma**  
**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

**avversità**  
 insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

**posizione**  
 isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_  
**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico(max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

CISDAM (Centro Italiano di Studi e di Documentazione sugli Abeti Mediterranei)

Via S. Liberata, 1 - 66040 Rosello (CH) Italia.

Tel. e Fax: (0039) 0872-948444. E-Mail: cisdam@tin.it

30

Foto di riferimento



## SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **2 (Camp. 2)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola**

### Dati stazionali

quota

m **46**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°23'87,41"**  
**LONG 13°47'29,22"**

### Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **45**  
 min (cm) **50**

altezza

TOTALE (m) **8**  
 fusto libero (m) **3**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico(max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**



Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **3 (Camp. 3)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola**

## Dati stazionali

quota

m **57**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°23'85,59"**  
**LONG 13°47'20,29"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **45**  
 min (cm) **50**

altezza

TOTALE (m) **7**  
 fusto libero (m) **2**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico(max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



## SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **4 (Camp. 4)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola**

### Dati stazionali

quota

m **49**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
<b>O</b>	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°23'86,30"**  
**LONG 13°47'05,98"**

### Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **25**  
 min (cm) **20**

altezza

TOTALE (m) **3**  
 fusto libero (m) **0,5**

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico(max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **5 (Camp. 5)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola**

## Dati stazionali

quota

m **53**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
<b>O</b>	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°23'83,82"**  
**LONG 13°47'08,96"**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **35**  
 min (cm) **30**

altezza

TOTALE (m) **6**  
 fusto libero (m) **2**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico (max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **6 (Camp. 6)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola - Viadotto Bassano**

## Dati stazionali

quota

m **43**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
<b>O</b>	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'37,18"**  
**LONG 13°46'13,87"**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **25**  
 min (cm) **20**

altezza

TOTALE (m) **3**  
 fusto libero (m) **2**

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

fisionomia

- monumentale  
 **X adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico (max. 5 cm), esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**



Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **7 (Camp. 7)**

Data **18 / 11 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Punta Cetarola - Viadotto Bassano**

## Dati stazionali

quota

m 45

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'35,25''**  
**LONG 13°46'13,66''**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) 20  
 min (cm) 15

altezza

TOTALE (m) 2  
 fusto libero (m) 1

rigenerazione

Gamica  Agamica

Rinnovazione affermata?

Si  No

fisionomia

- monumentale  
 adulto  
 **giovane**  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  normale  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  normale  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



• **CAMPIONAMENTO SUL PROMONTORIO GROTTA DI TIBERIO**

SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **1 (Camp. 1)**

Data **31 / 12 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

---

Comune: **Sperlonga** Località **Grotta di Tiberio**

**Dati stazionali**

quota  
m **40**

pendenza

0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'92,88"**

**LONG 13°45'19,13"**

---

**Caratteristiche individuo**

diametro

max (cm) **20**  
 min (cm) **15**

altezza

TOTALE (m) **2**  
 fusto libero (m) **1**

fisionomia

monumentale  
 adulto  
 **X giovane**  
 senescente

rigenerazione

**X Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**X Si**  No

---

chioma

**Aspetto fogliare**  **X normale**  clorotico  necrotico

**Densità fogliare**  **X normale**  ridotta

avversità

insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

---

posizione

isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_  

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

---

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

CISDAM (Centro Italiano di Studi e di Documentazione sugli Abeti Mediterranei)  
 Via S. Liberata, 1 - 66040 Rosello (CH) Italia.  
 Tel. e Fax: (0039) 0872-948444. E-Mail: cisdam@tin.it

44

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **2 (Camp. 2)**

Data **31 / 12 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Grotta di Tiberio**

## Dati stazionali

quota

m **47**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'94,54"**  
**LONG 13°45'20,33"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) **35**  
 min (cm) **30**

altezza

TOTALE (m) **5**  
 fusto libero (m) **2**

fisionomia

- monumentale  
 **adulto**  
 giovane  
 senescente

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

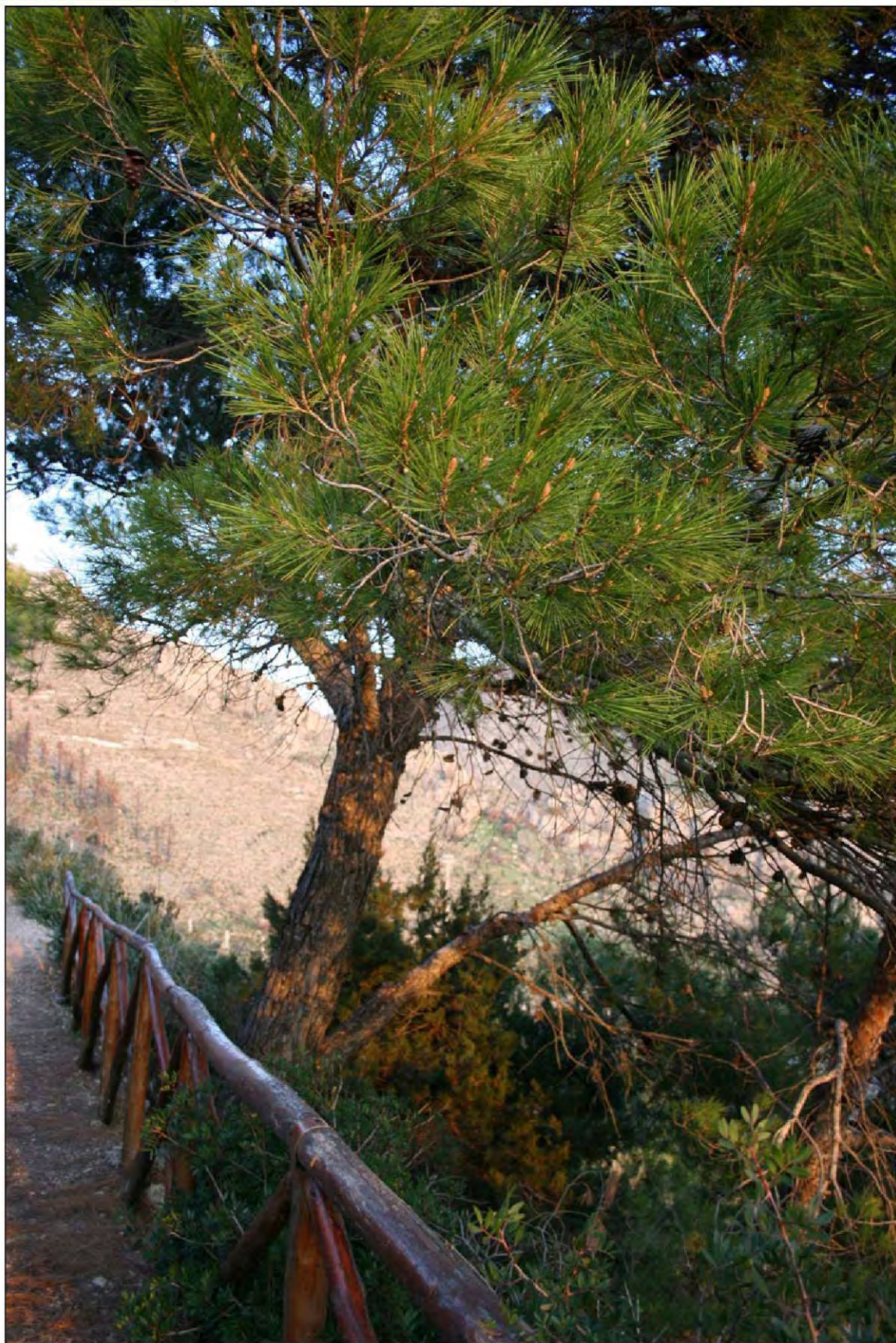
posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **3 (Camp. 3)**

Data **31 / 12 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Grotta di Tiberio**

## Dati stazionali

quota

m **49**

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
<b>SO</b>	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'96,42"**  
**LONG 13°45'07,72"**

## Caratteristiche individuo

diámetro

max (cm) **30**  
 min (cm) **25**

altezza

TOTALE (m) **4**  
 fusto libero (m) **2**

rigenerazione

**Gamica**  Agamica

Rinnovazione affermata?

**Si**  No

fisionomia

- monumentale  
 **X adulto**  
 giovane  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  **normale**  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  **normale**  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**



Foto di riferimento



# SCHEDA DI RILEVAMENTO

N° campione **4 (Camp. 4)**

Data **31 / 12 / 2007**

Operatore: **Associazione CISDAM**

Comune: **Sperlonga** Località **Grotta di Tiberio**

## Dati stazionali

quota

m 42

pendenza

- 0 - 10°  
 10° - 20°  
 20° - 30°  
 > 30°

esposizione

NO	N	NE
O	piano	E
SO	S	SE

GPS

punto o coordinate

**LAT 41°24'92,87"**  
**LONG 13°45'18,25"**

## Caratteristiche individuo

diametro

max (cm) 20  
 min (cm) 15

altezza

TOTALE (m) 3  
 fusto libero (m) 1

rigenerazione

Gamica  Agamica

Rinnovazione affermata?

Si  No

fisionomia

- monumentale  
 **X giovane**  
 adulto  
 senescente

chioma

**Aspetto fogliare**  normale  clorotico  necrotico  
**Densità fogliare**  normale  ridotta

avversità

- insetti \_\_\_\_\_  
 funghi \_\_\_\_\_  
 incendi \_\_\_\_\_  
 epifite \_\_\_\_\_

posizione

- isolato in:  campo agricolo coltivato a \_\_\_\_\_  
 giardino ( ) privato ( ) parco pubblico  
 in filare  bordo strada ( ) principale ( ) secondaria  
 siepe agricola di confine  
 in bosco  fustaia {pianta [ ] dominante [ ] dominata}  
 ceduo {pianta [ ] matricina [ ] pollone }  
 ↓  
 a prevalenza di \_\_\_\_\_

**X in bosco non sottoposto a forme di governo**

**Caratteristiche suolo: scarsa presenza di materiale pedogenetico, esclusiva presenza di roccia nuda affiorante di matrice calcarea**

Foto di riferimento



## 2 METODOLOGIE DI ANALISI

Un primo processo dei campioni prelevati è la liofilizzazione (in inglese detta anche *freeze-drying*), è un processo tecnologico di disidratazione che permette l'eliminazione dell'acqua da una matrice organica. Il suo notevole interesse scaturisce dalla natura non-distruttiva del metodo che si basa sul processo della *sublimazione*: l'acqua è rimossa dal materiale congelato essendo convertita direttamente in vapore senza passare per lo stato liquido. Tale processo, come è visibile dal diagramma di stato dell'acqua, (**figura 2**) si verifica esclusivamente in determinate condizioni di pressione e temperatura.

Il passaggio della componente acquosa dallo stato solido a quello di vapore, infatti, può realizzarsi secondo due modalità: a pressione costante, mediante assorbimento del calore e prevedendo una transizione attraverso lo stato liquido; o a temperatura costante mediante riduzione delle condizioni di pressione, assicurando l'immediata trasformazione in vapore. In quest'ultimo caso il vantaggio risiede nella possibilità di ottenere la disidratazione dei tessuti vegetali senza alterarne le strutture cellulari in seguito a fenomeni degradativi associati ad un innalzamento termico. I campioni vegetali così ottenuti risultano non solo integri per caratteristiche biologiche, ma capaci di affrontare un processo conservativo a lungo termine.

Nel presente lavoro, la realizzazione del processo di liofilizzazione è stata affidata ad uno strumento (FreeZone 2,5 Liter – Labconco) che risulta composto da 2 componenti fondamentali: una pompa da vuoto, indispensabile a creare quelle condizioni di pressione (0,133 mBar) utili allo svolgimento del processo di sublimazione ed un collettore in grado di assicurare una temperatura di circa - 45°C necessaria ad intrappolare in ghiaccio il vapor acqueo prodotto (**figura 3**). Questi elementi, infatti, ricoprono un ruolo di primaria importanza nell'assicurare un flusso continuo del vapor acqueo dal materiale organico congelato al collettore dove incontra il processo di condensazione.

Il materiale vegetale utilizzato nel presente lavoro (1-2 rametti di circa 20 cm per ciascun albero) è stato raccolto in campo e conservato in borse termiche a 4°C, quindi tempestivamente consegnato presso il laboratorio di Ecologia Molecolare degli Alberi Forestali del Dipartimento Ambiente e Foreste (D.A.F) dell'Università degli studi della Tuscia di Viterbo. Le foglie dei 30 campioni di Pino d'Aleppo sono state tagliate in frammenti di piccole dimensioni (circa 1 cm) avendo cura di eliminare le parti interessate da aree ingiallite e necrotiche; quindi, sottoposte preventivamente ad un trattamento di pre-refrigerazione a -20°C, sono state liofilizzate. Così facendo, si sono create le condizioni affinché tale processo si realizzasse nel più breve tempo possibile: 12 ore di permanenza dei campioni vegetali nel liofilizzatore sono risultate sufficienti ad operare un efficace processo di disidratazione.

In seguito, i campioni di tessuto fogliare disidratato sono stati accuratamente ridotti in polvere con l'ausilio di un pestello e di un mortaio in presenza di una minima quantità di sabbia di quarzo, al fine di

ottenere una polvere organica il più possibile sottile, requisito indispensabile ad ottimizzare il processo di estrazione del DNA.

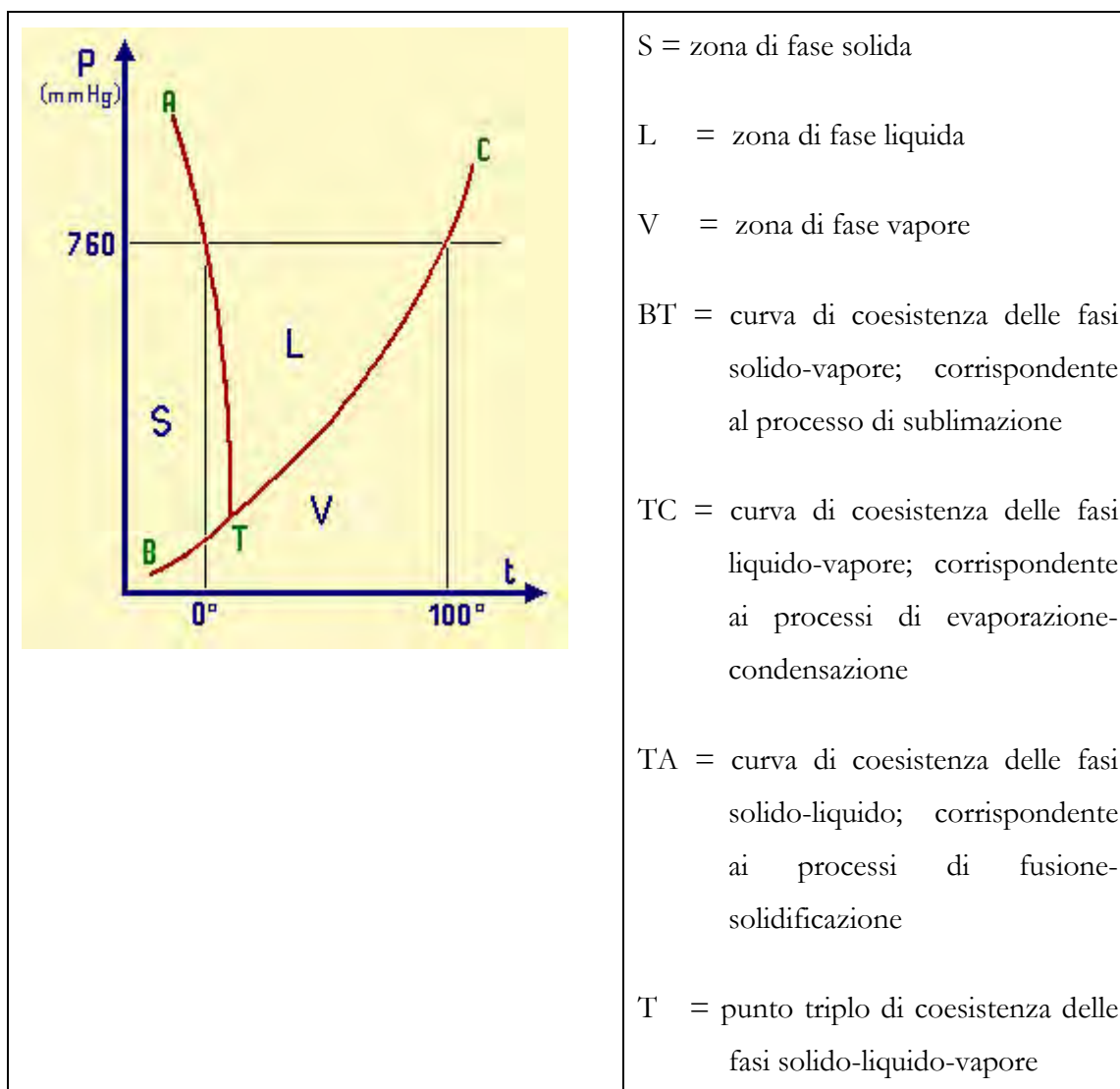


Figura 2 - Diagramma di stato dell'acqua.



**Figura 3 - Liofilizzatore**

## **2.1 Estrazione del DNA**

Per l'estrazione del materiale genetico, è stato utilizzato un kit commerciale (DNeasy Plant Minikit, Qiagen) specificamente preposto per l'estrazione del DNA che comporta l'uso di vari tamponi e di due diverse colonnine "Microspin" per la purificazione dell'acido nucleico.

La procedura di estrazione è stata condotta su 50 mg di liofilizzato attraverso le seguenti fasi: lisi cellulare; digestione con RNAsi A; precipitazione e filtrazione dei residui cellulari; legame del DNA ad una colonna a scambio molecolare, successivo lavaggio della colonna ed eluizione del DNA estratto.

Di seguito, la descrizione delle fasi di estrazione:

Lisi cellulare: 50 mg di liofilizzato tissutale sono stati trasferiti in un tubo da microcentrifuga della capacità di 2,0 ml dove sono stati aggiunti 400 µl del Buffer AP1 (soluzione di lisi).

Digestione con RNAsi: al fine di evitare delle contaminazioni di RNA, sono stati aggiunti 2 µl di enzima per campione. Dopo l'omogeneizzazione della mix contenuta nel tubo su vortex, si è proceduto con l'incubazione a 65°C per 10 minuti.

Precipitazione dei residui cellulari: a fine incubazione, sono stati aggiunti 130 µl di Buffer AP2 (Soluzione di precipitazione); omogeneizzando la mix per inversione e mantenendo i campioni in ghiaccio per 5 minuti, si è favorita la precipitazione del detergente, delle proteine e dei polisaccaridi; i campioni sono stati successivamente centrifugati in una microcentrifuga per 5 minuti alla massima velocità (13.000 rpm) al fine di allontanare i residui cellulari;

Filtrazione dei residui cellulari: il sovranatante prelevato è stato posto su un tubo da 2,0 ml provvisto di colonna per filtrazione (QIAshredder Minispin) e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti; a fine centrifugazione è stata scartata la colonna su cui si sono depositati i residui cellulari mantenendo il filtrato all'interno del tubo;

Legame del DNA ad una colonna a scambio molecolare: al filtrato, ottenuto dalla precedente fase, si sono aggiunti 700 µl di Buffer AP3/E (diluito precedentemente con 60 ml di etanolo al 95%) , una soluzione contenente guanidina tiocianato in grado di creare le condizioni per legare il DNA alla colonna a scambio molecolare (Soluzione di legame); 700 µl della mix, omogeneizzata per inversione, sono stati prelevati e trasferiti in tubo da microcentrifuga di 2,0 ml fornito di una colonna in silice (Colonna di legame) e sottoposti a centrifugazione per 1 minuto; tale operazione è stata ripetuta sulla restante mix utilizzando lo stesso tubo con colonna in silice e scartando il filtrato;

Lavaggio della colonna: la colonna, la cui funzione è quella trattenere il DNA, è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW (soluzione di lavaggio, precedentemente diluita con 40 ml di etanolo al 95%) ed è stata eseguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto; scartando il filtrato, l'operazione è stata ripetuta con altri 500 µl della soluzione di lavaggio avendo cura che nessun residuo di questa fosse trattenuto dalla colonna;

Eluizione del DNA: dopo il lavaggio la colonna è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; ad essa sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione di eluizione a basso contenuto salino (Buffer AE) lasciando incubare per 30 minuti a temperatura ambiente; è seguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto.

Il DNA, estratto col metodo descritto, può essere conservato nella soluzione utilizzata per l'eluizione per breve tempo a 4°C o, per lungo tempo, a -20°C.

## **2.2 Determinazione della quantità e della qualità del DNA estratto**

I campioni di DNA ottenuti dopo l'estrazione, sono stati sottoposti a determinazione quantitativa, mediante fluorimetro (Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer – Invitrogen) e, qualitativa, mediante corsa elettroforetica.

Il metodo fluorimetrico si basa sulla proprietà che ha una soluzione colorante (Quant-it<sup>TM</sup> Reagent) di formare legami con l'adenina e la timina presenti nella molecola di DNA e di emettere fluorescenza. In questo modo si può determinare in maniera precisa la concentrazione del DNA presente nella soluzione rilevando la fluorescenza emessa dal quantitativo che ha interagito con il DNA. Per operare tali determinazioni e' necessario effettuare una calibrazione dello strumento utilizzando soluzioni di DNA Standard che abbiano una percentuale di adenina e timina simile a quella prevista dei campioni da determinare quantitativamente. Al contrario dei metodi spettrofotometrici, le impurità che

normalmente si possono ritrovare nel DNA (proteine, oligonucleotidi e solventi organici) non causano la minima influenza nella determinazione quantitativa del DNA.

Il fluorimetro (**figura 4**) fornisce il valore della concentrazione dei campioni espresso in  $\mu\text{g/ml}$ ; tuttavia, tali valori corrispondono alla concentrazione dei campioni in seguito alla diluizione eseguita con la soluzione di analisi (Working Solution = Quant-it™ Buffer + Quant-it™ Reagent). Per il calcolo effettivo delle concentrazioni è stata, dunque, utilizzata la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione del campione} = \text{valore QF} \times (200/x)$$

dove: valore QF = valore fornito dal fluorimetro;

x = numero dei microlitri di campione aggiunti alla soluzione di analisi;

200 = volume finale ( $\mu\text{l}$ ) dei campioni.

Tale metodica di quantificazione, tuttavia, non consente di avere informazioni relativamente al grado di integrità del DNA estratto.

La qualità del DNA estratto, infatti, è stata verificata mediante elettroforesi su gel all'1% di agarosio. La polvere di agarosio è stata sciolta a caldo in tampone TBE 1X, con l'aggiunta di bromuro di etidio, una sostanza a struttura aromatica che intercalandosi nella doppia elica del DNA la rende visibile ai raggi ultravioletti. La soluzione così ottenuta è stata fatta gelificare su un apposito vassoio e con l'ausilio di un "pettine" sono stati prodotti dei pozzetti dove sono stati caricati 5  $\mu\text{l}$  dei quattro differenti campioni di DNA e un marcatore di peso molecolare (standard DNA molecular weight).

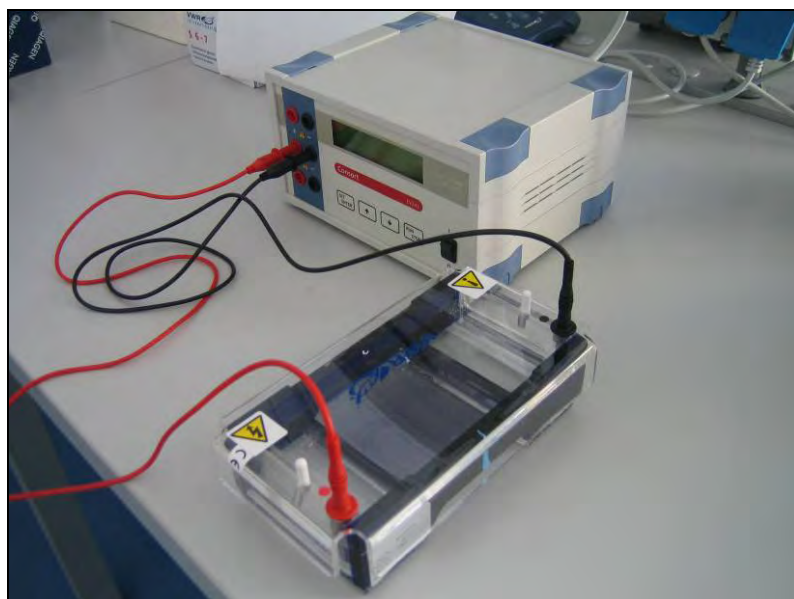
Il gel solidificato è stato posto in una cella elettroforetica (**figura 5**) contenente il buffer TBE 1X ed applicando agli elettrodi una differenza di potenziale elettrico di 80 V (d.d.p.) per circa 2 ore.

Al termine della corsa elettroforetica è stato possibile osservare i campioni mediante un transilluminatore a raggi UV, per stimare la concentrazione, il grado di pulizia e di integrità del DNA e procedere, quindi, con le indagini successive.

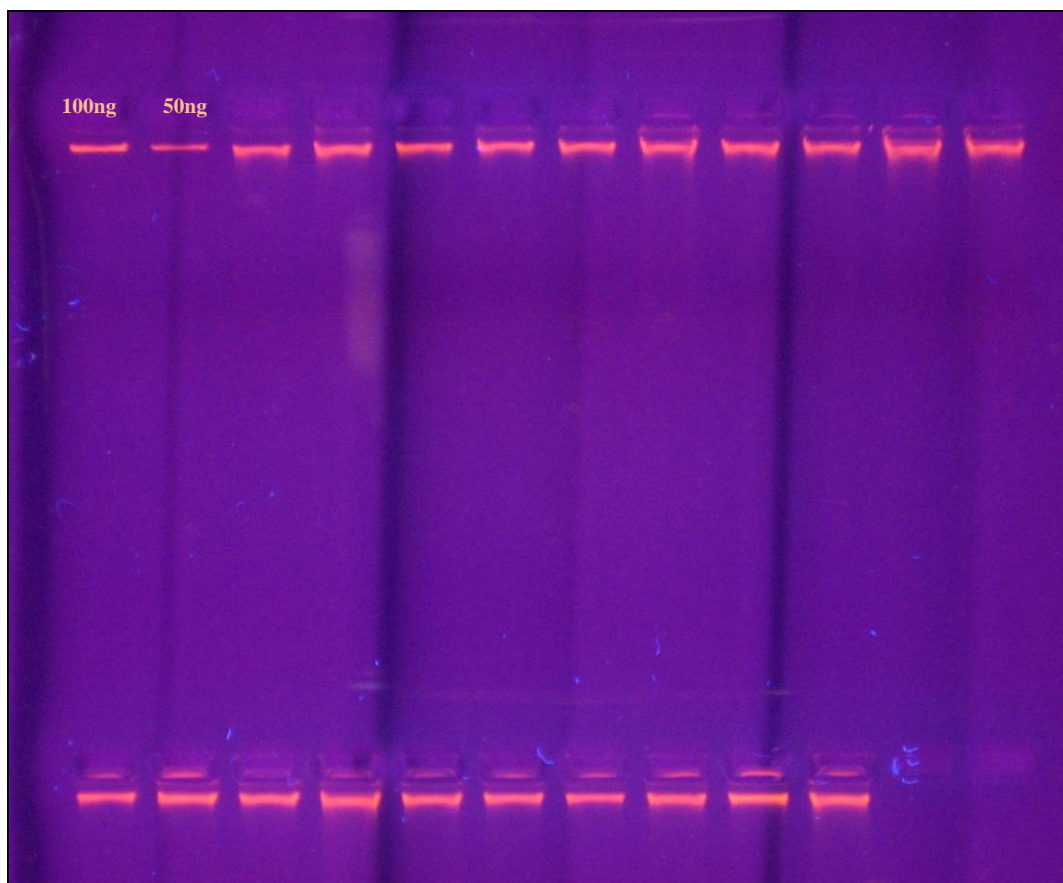




**Figura 4 - Fluorimetro**



**Figura 5 - Cella elettroforetica**



**Figura 6 - Foto al transilluminatore dei primi 20 campioni estratti di DNA di Pino d'Aleppo; i primi 2 campioni sono gli standard di riferimento per la concentrazione.**

Tutti i DNA estratti hanno evidenziato di essere di ottima qualità (non degradati) e in concentrazioni comprese tra i 100 e i 200 ng/ $\mu$ l, cioè più che sufficienti per oltre 100 analisi di tipo molecolare.

### **2.3 Analisi della variabilità genetica**

Dal punto di vista applicativo, la valutazione della variabilità genetica di una specie, cioè delle sue risorse genetiche, procede da una fase di inventario (caratterizzazione) delle diverse componenti genetiche possedute sia dai popolamenti che vegetano in aree diverse che dagli individui all'interno di uno stesso popolamento. Ne consegue la derivazione di parametri genetici quali l'eterozigosità, la diversità, la divergenza, atti a individuare le specie o i popolamenti a rischio di erosione e deriva genetica (fluttuazione stocastica della variabilità esistente e perdita delle risorse genetiche), così come anche ad evidenziarne la peculiarità di altre, fino a riflettere l'origine, la migrazione e le aree di rifugio di determinate linee evolutive. Infine, la caratterizzazione genetica consente di individuare le migliori metodologie di conservazione delle risorse genetiche di una specie, tramite stime del tasso di consanguineità, del flusso genico, della dimensione effettiva della popolazione.

L'analisi della variabilità genetica presente in una specie viene oggi eseguita utilizzando i cosiddetti marcatori molecolari [RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ITS (Internal transcribed spacer), proteine di riserva, isoenzimi ecc.]. Sistemi più potenti, in Italia ancora scarsamente applicati alle specie forestali e più adatti per studi di tipo filogeografico e di determinazione/certificazione delle provenienze sono i microsatelliti (SSR, Simple Sequence Repeats) e le tecniche degli AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism). In particolare, l'analisi della variabilità dei microsatelliti del DNA contenuto nel genoma plastidiale delle diverse specie forestali è il sistema ritenuto più efficace in base al rapporto qualità delle informazioni/tempi e costi necessari.

L'analisi di questo marcatore è attuabile grazie all'impiego di una tecnica detta PCR (Polymerase Chain Reaction). Questa consente l'amplificazione di grandi quantità di frammenti specifici di DNA mediante un particolare enzima, la Taq polimerasi, e l'impiego di un ciclizzatore termico, la cui funzione consiste nel ripetere decine di volte il ciclo termico ottimale per le fasi di (1) denaturazione della doppia elica del DNA estratto da ciascun campione, (2) appaiamento di inneschi specifici (primers microsatellitari) per la reazione enzimatica, (3) sintesi della copia esatta del frammento sotto studio (microsatellite del DNA plastidiale). Il prodotto di amplificazione è evidenziato tramite rilevamento di molecole fluorescenti contenute negli inneschi utilizzati con un lettore laser collegato all'apparecchio per la separazione dei diversi prodotti nei vari campioni analizzati. Tale separazione avviene per elettroforesi capillare in un DNA Sequencer, e l'eventuale polimorfismo di lunghezza dei frammenti amplificati nei diversi campioni costituisce una prova di diversità nell'analisi genetica.

Nel nostro studio, sono stati scelti 8 inneschi specifici (primers) per altrettante regioni microsatellitari in base alle informazioni pubblicate su 2 articoli scientifici dedicati alla variabilità genetica dei pini mediterranei: "A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae" (1996 - Vendramin, Lelli, Rossi e Morgante, *Molecular Ecology* 5, pp. 595-598) e "Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait.) along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers" (2005 - Gomez, Vendramin, Gonzales e Alia, *Diversity & Distribution* 11, pp. 257-263). Gli 8 primers sono stati scelti per la loro provata efficacia nell'evidenziare i polimorfismi nel Pino d'Aleppo e sono indicati dalle sigle:

Pt 15169, Pt 26081, Pt 36480, Pt 41093, Pt 71936, Pt 79951, Pt 87268, Pt 110048.

Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato:

- 5 min. di denaturazione a 95°
- 1 min. a 94°, 1 min. a 55°, 1 min. a 72°, ripetuto 25 volte

- 8 min. a 72° di estensione finale

Il volume delle reazioni (10 µl totali) comprendeva:

- i 4 nucleotidi necessari alla sintesi del DNA, ciascuno 0,2 mM
- MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM)
- 0,2 µM di ciascun primer
- 1X del tampone di reazione dell'enzima TAQ
- 0,2 U dell'enzima TAQ (Eppendorf).
- 20 ng del DNA di ciascun campione

Le reazioni di PCR sono state condotte su un termocicizzatore MJ 4180 (BIORAD, figura 6).

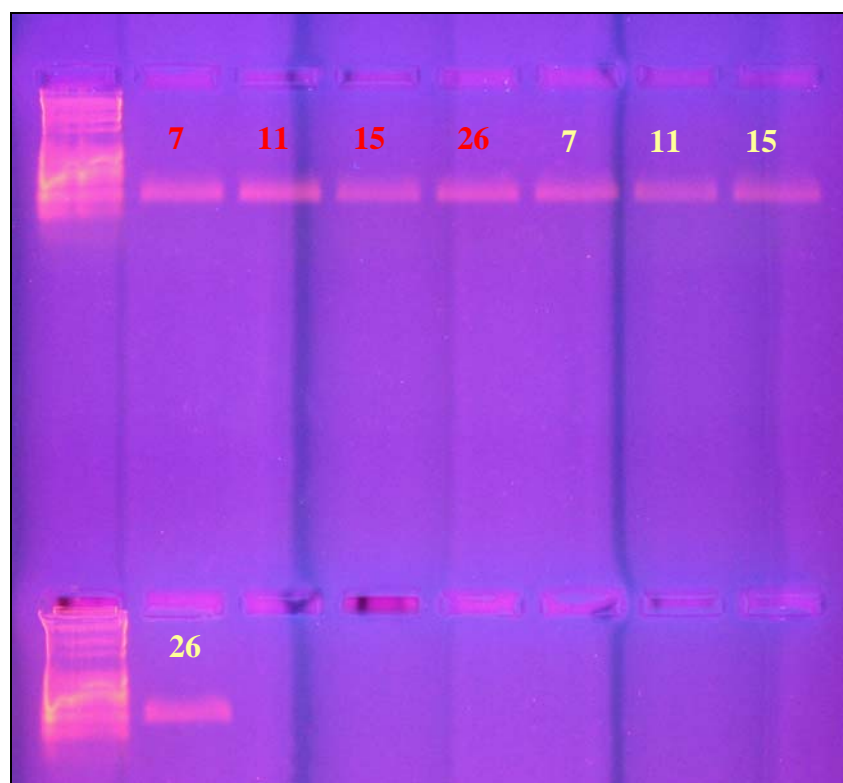


**Figura 7 - il termocicizzatore BIORAD con il quale sono state condotte le amplificazioni PCR nel presente lavoro**

I primer erano stati prima legati, mediante una reazione di ligazione enzimatica, a delle code di DNA chiamate M13 e recanti i diversi gruppi fluorescenti adibiti al rilevamento finale del segnale:

FAM 20<sup>TM</sup>, VIC<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup>, PET<sup>TM</sup>, HEX<sup>TM</sup> (Applied Biosystems).

Il funzionamento di questa sequenza di protocolli è stato dapprima testato su pochi genotipi, per verificarne l'effettiva applicabilità. Il risultato è stato positivo, come dimostrato dall'immagine riportata in figura 7, che ha dimostrato l'avvenuta amplificazione del microsatellite siglato Pt 87268 su 4 genotipi di Pino d'Aleppo utilizzati in concentrazioni decrescenti di DNA.



**Figura 8 - microsatellite Pt 87268 in 4 genotipi di Pino d'Aleppo scelti a caso (n. 7, 11, 15, 26).  
In rosso : 25 ng di DNA, in giallo : 50 ng di DNA.**

## **2.4 Analisi genetiche**

Una volta messo a punto il protocollo di analisi della variabilità genetica in Pino d'Aleppo, mediante studio della diversità dei microsatelliti plastidiali, le amplificazioni sono state condotte sui 30 genotipi campionati e con ciascuno degli 8 primers scelti, per un totale di 240 reazioni. Tali reazioni sono state analizzate su un DNA Sequencer, modello ABI 3130 XI Genetic Analyzer (Applied Biosystems, figura 9). I risultati, di cui è riportato un esempio in figura 10, sono stati infine elaborati con il software Genotypes Plot.

I risultati preliminari hanno visto la comparazione di tutti i microsatelliti individuati nei 30 campioni analizzati; tale comparazione permette di prefigurare l'esistenza di una buona variabilità genetica tra i diversi genotipi. I passi successivi permetteranno di stabilire una correlazione geografica tra gruppi di individui simili.



Figura 9 - il modello ABI 3130 XL Genetic Analyzer utilizzato nel presente lavoro

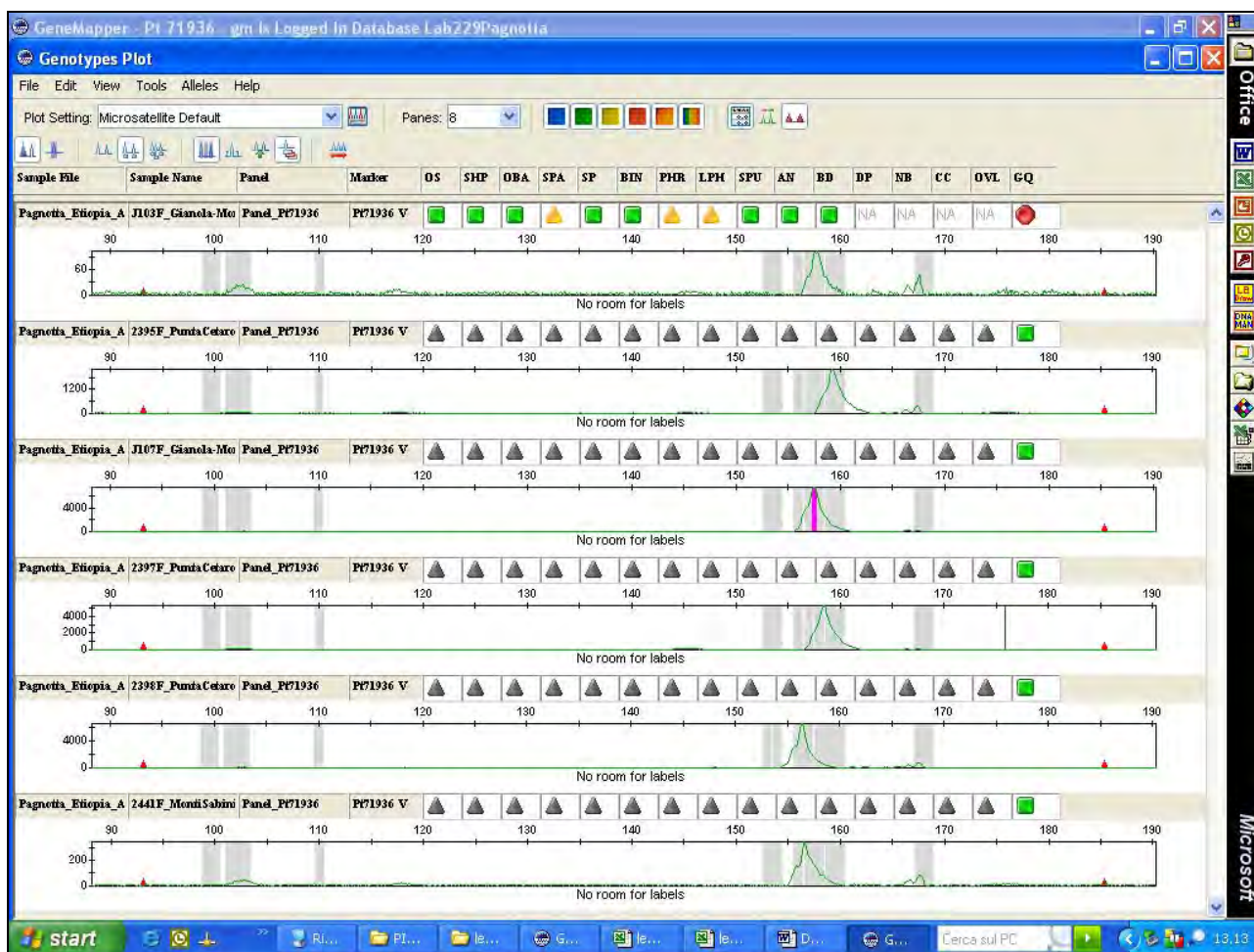


Figura 10 -esempio di microsatellite rilevato su Pino d'Aleppo.

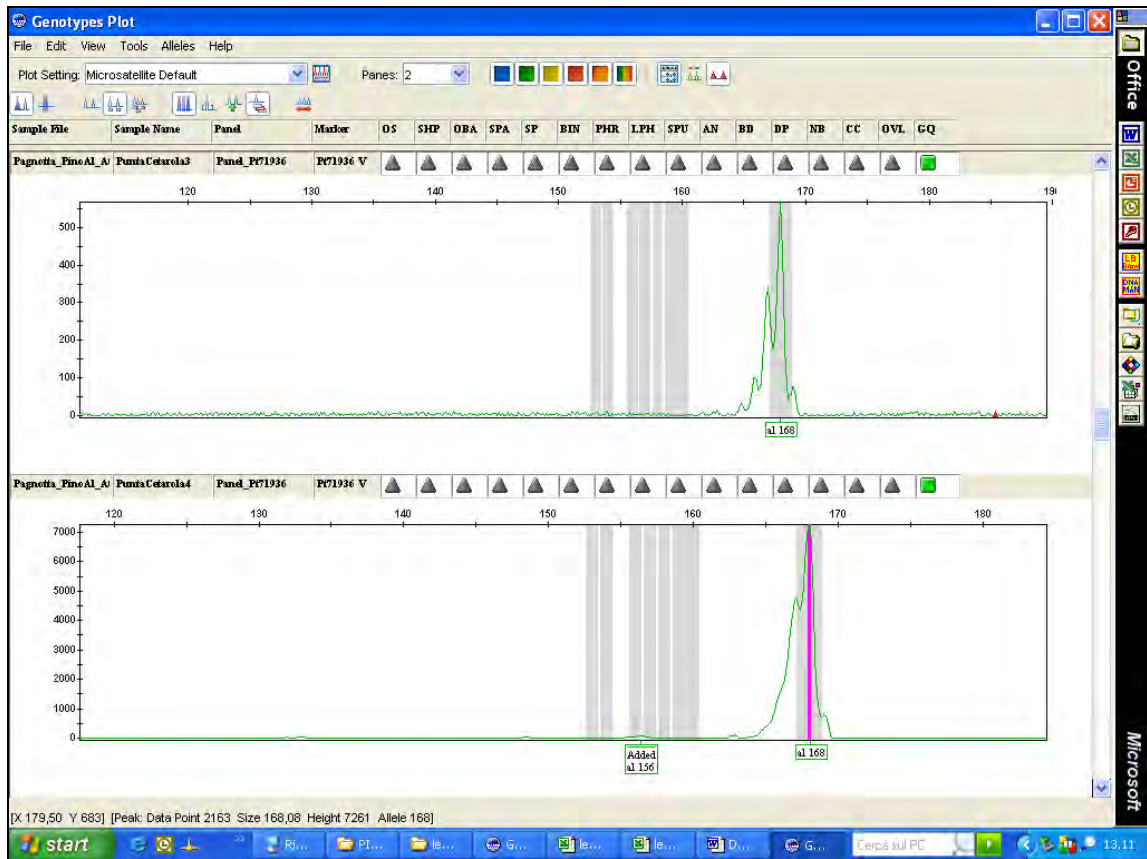


Figura 11 - esempio di due “picchi” di microsatellite rilevato su Pino d’Aleppo.

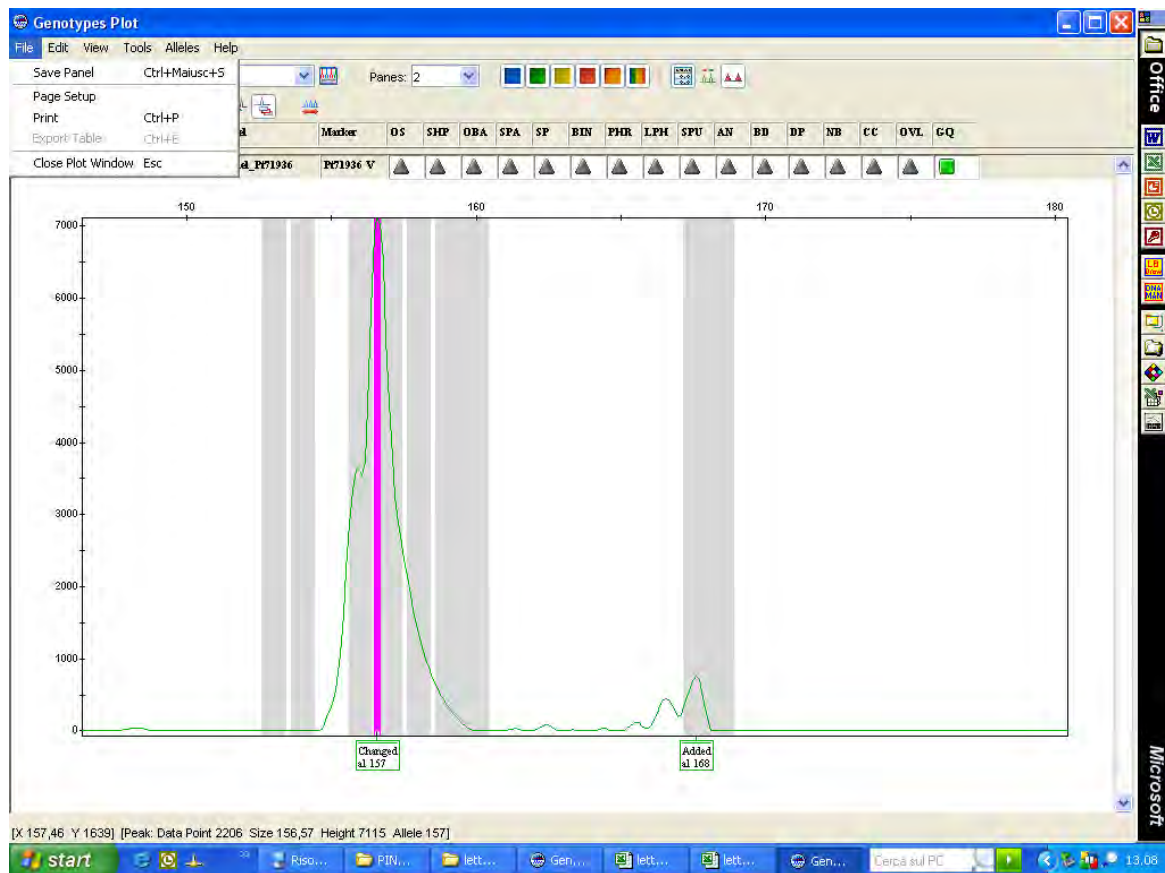


Figura 12 -esempio di una selezione amplificata di microsatellite rilevato su Pino d’Aleppo.

Sample Name	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Height 1	Height 2	Height 3	GQ
Gianola-MonteScauri1F	179			4737			1
Gianola-MonteScauri2F	180			6135			0,3468
Gianola-MonteScauri3F	180			6928			0,1734
Gianola-MonteScauri4F	180	192		7157	92		1
Gianola-MonteScauri5F	179	191		4643	59		1
Gianola-MonteScauri6F	183	193		6262	6908		0,0781
Gianola-MonteScauri7F	181			5553			0,4137
Gianola-MonteScauri8F	182			2859			1
MonteOrlando-MonteSpaccata1F	180	192		7217	1978		0,0548
MonteOrlando-MonteSpaccata2F	180	192		7194	113		1
MonteOrlando-MonteSpaccata3F	180			6858			0,1734
MonteOrlando-MonteSpaccata4F	181	192		6875	188		1
MonteOrlando-MonteSpaccata5F	183	192		5681	6936		0,1734
PuntaCetarola1F							0
PuntaCetarola2F	184			1351			0,4383
PuntaCetarola3F	183			1323			0,4383
PuntaCetarola4F	179			6871			1
PuntaCetarola5F							0
ViadottoBassano1F							0
ViadottoBassano2F	180	192		288	56		1
Sperlonga-GrottadiTiberio1F	180			2572			0,4382
Sperlonga-GrottadiTiberio2F							0
Sperlonga-GrottadiTiberio3F							0
Sperlonga-GrottadiTiberio4F							0

**Figura 13 - Tabella dei risultati analitici ottenuti**

### **3 GRUPPO DI LAVORO**

- *Analisi genetiche - Dott.ssa Laura Armenise*
- *Analisi dei dati genetici - Dott. Marco Simeone*
- *Campionamento e descrizione dei siti campionati - Dott. Emiliano Agrillo e Dott.ssa Laura Casella*
- *Coordinamento Scientifico - Prof. Francesco Spada e Prof. Bartolomeo Schirone*