



PNR “RIVIERA DI ULISSE”

INDAGINI PRELIMINARI SULLA SCELTA DEGLI INDIVIDUI DI PINO D'ALEPPO DA CUI PRELEVARE IL SEME (SCHEDATURA, MARCATURA, INDIVIDUAZIONE DI AREE DI RIPOPOLAMENTO) E ANALISI DELLA STRUTTURA GENETICA DELLA POPOLAZIONE LOCALE DI PINO NELL'AMBITO DEL PROGETTO “BANCA DEL GERMOPLASMA DI *PINUS HALEPENSIS* DELLA COSTA D'ULISSE (LAZIO MERDIONALE)” NEL S.I.C. GIANOLA E M. DI SCAURI (IT6040023)



CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

DICEMBRE 2008

SOMMARIO

1	RISULTATI DELLE ANALISI GENETICHE SVOLTE SU INDIVIDUI SCELTI DI <i>P.HALEPENSIS</i> ..	3
2	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	6
3	INDICAZIONI SULLA MESSA A DIMORA DEGLI INDIVIDUI PRESCELTI	9
4	MONITORAGGIO	10
5	BIBLIOGRAFIA	12
6	GRUPPO DI LAVORO	13

1 RISULTATI DELLE ANALISI GENETICHE SVOLTE SU INDIVIDUI SCELTI DI P.HALEPENSIS

Per comparare i risultati dell’analisi genetica effettuata sulle popolazioni di *P. halepensis* presenti lungo la costa tra Sperlonga, Gaeta e il promontorio di Gianola, sono stati utilizzati i dati relativi ad alcune popolazioni note dell’Italia Centrale, al fine di valutare quale sia il reale grado di isolamento genetico della specie presente sulle coste meridionali del Lazio.

Successivamente alla estrazione del materiale genetico dai campioni di *P. halepensis* prelevati in *loco*, sono stati individuati 8 inneschi specifici, definiti tecnicamente *primers*, per altrettante regioni microsatellitari in base alle informazioni raccolte letteratura scientifica sulla variabilità genetica dei pini mediterranei: (cfr.: Vendramin et Al 1996. *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae.* . Molecular Ecology, 5: 595-598 ; Gomez et Al. 2005. *Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines - Pinus halepensis Mill. and Pinus pinaster Ait - along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers.* Diversity and Distribution, 11: 257-263). Gli otto *primers* sono stati scelti per la loro provata efficacia nell’evidenziare i polimorfismi, cioè una variazione a livello di una sequenza di acidi nucleici nel DNA che si presenta tra individui della stessa specie. Negli individui di Pino d’Aleppo i *primers* utilizzati sono indicati dalle sigle riportate in tabella 1.

PRIMERS	PCR product size
Pt 15169	123-133
Pt 36480	150-186
Pt 110048	99-107
Pt 87268	180-194
Pt 71936	152-160
Pt 41093	91-101
Pt 79951	144-168
Pt 26081	114-132

Tabella 1 - Lista dei ” Primers” utilizzati e dimensioni dei risultati ottenuti

Tutti gli inneschi specifici definiti (*primers*) hanno generato specifiche “fasce polimorfiche”, come rappresentato analiticamente nella tabella 1 colonna “PCR product size” .

I dati analizzati hanno mostrato come le popolazioni presentino un grado di polimorfismo variabile da 0,40 a 1,00 (riferito alla tabella 2 – colonna **P**). Il numero medio di alleli presenti per ogni locus varia tra 1,40 e 4,22 (colonna **A**). In entrambe le analisi i valori più bassi sono stati riscontrati nelle popolazioni di Viadotto Bassano (Sperlonga) e Grotta di Tiberio (Sperlonga).

Population	P	A	He	Ho
Gianola-Monte Scauri	0.80	2.60	0.44	0.55
Monte Orlando-Monte Spaccata	1.00	2.60	0.57	0.54
Punta Cetarola	0.90	2.50	0.53	0.24
Viadotto Bassano	0.40	1.40	0.33	0.30
Sperlonga-Grotta di Tiberio	0.50	1.75	0.31	0.43
Monti Sabini – stazione di confronto	0.80	2.50	0.48	0.41
Pescara – stazione di confronto	1.00	4.22	0.62	0.28
Valnerina – stazione di confronto	0.89	4.22	0.51	0.31

Tabella 2 – Analisi statistica che riporta la proporzione di loci polimorfici (P), la media numerica degli alleli presenti per ogni locus (A), eterozigotà attesa (He) e osservata (Ho).

In tutti i campioni analizzati il valore medio osservato dell'eterozigotà risulta molto basso, compreso tra 0,24 e 0,55. In particolare, nell'ambito degli individui campionati nelle diverse aree comprese tra Sperlonga e Gianola, si evidenziano i valori molto bassi di eterozigotà osservata relativi ai campioni di *P. halepensis* di Punta Cetarola (valore 0,24) e di Viadotto Bassano (valore 0,30). Diversamente, pur differenziandosi tra loro, risultano esser più alti i valori di eterozigotà osservata nelle altre stazioni (Gianola, Monte Orlando e Sperlonga).

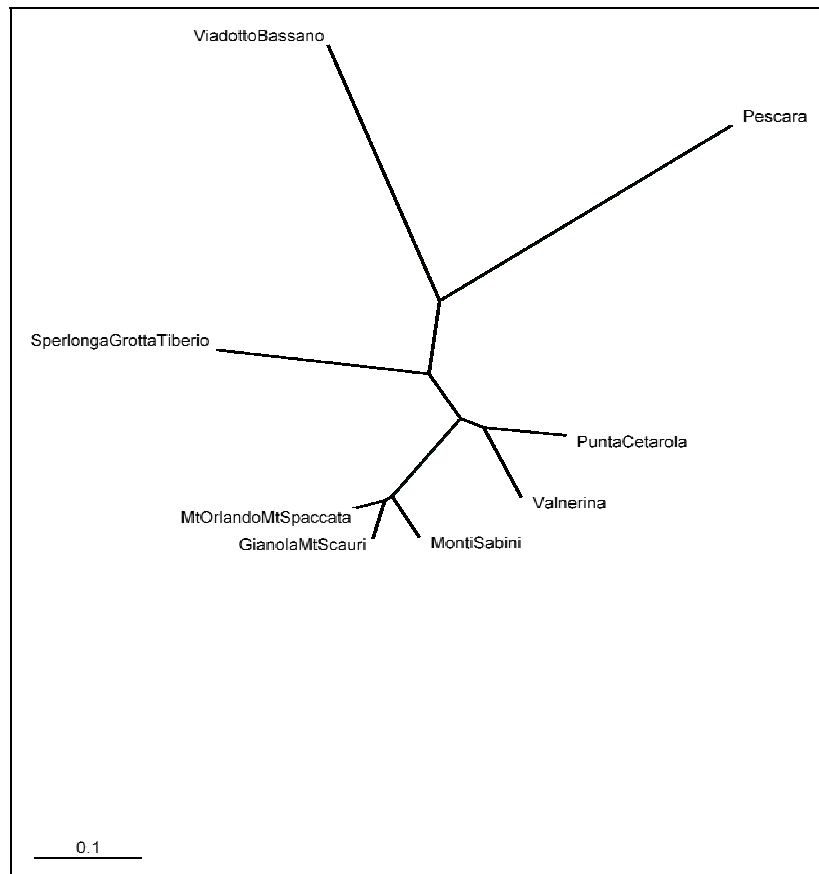


Figura 1 – Fenogramma creato con il metodo “UPGMA”, che descrive la similarità genetica tra tutti gli individui di Pino D’Aleppo campionati

Il fenogramma in Figura 1, mostra una certa separazione tra i valori dei campioni di Pescara con le due stazioni campionate prossime alla cittadina di Sperlonga (Viadotto Bassano e Grotta di Tiberio). Diversamente scendendo più a Sud di Sperlonga gli individui campionati a Punta Cetarola mostrano una certa distanza con i

precedenti, e una certa vicinanza genetica con i campioni della Valnerina. Separati dagli ultimi appena descritti sono invece risultati i campioni dei Monti Sabatini, Monte Orlando e Promontorio di Ganola-Scauri.

Dai risultati preliminari sembrerebbe essere supportata l'ipotesi di un indigenato di Pino D'Aleppo, definito da un "isolato" valore di eterozigotità nelle aree ricadenti nelle località topografiche di Monte Orlando e del Promontorio di Gianola.

Più complesso sembrerebbe essere l'assetto genetico delle popolazioni di pino presenti a nord di Gaeta (Punta Cetarola, Viadotto Bassano e Grotta di Tiberio-Sperlonga). In tali aree il valore di eterozigotità osservata è alquanto disomogeneo, destando una certa perplessità sull'origine popolazioni presenti nell'area cecuba. Questa è infatti andata soggetta a ripetute campagne di rimboscimento a seguito dei ripetuti incendi del dopoguerra soprattutto nel tratto compreso tra il viadotto Bassano e Grotta di Tiberio-Sperlonga, dove è stato impiegato materiale da impianto di origine sconosciuta ma sicuramente alloctona. Ciononostante, in quest'area è verosimile si sia conservato anche qualche gruppo di individui, su siti rupestri, in posto già in epoca precedente a questi interventi, corrispondente a un ceppo originario di *Pinus halepensis*. La messa a dimora di migliaia di individui di origine alloctona potrebbe aver provocato un generale appiattimento della variabilità genetica locale in analogia con le località della Valnerina ove analogo immissione di materiale genetico alloctono, probabilmente della stessa origine (garganica o tarantina) ha avuto luogo nella stessa epoca. Anche dalla analisi spaziale mediante l'utilizzo di tecniche specifiche di modellizzazione geografica, è possibile constatare come si discostino i valori di eterozigotità misurati tra i popolamenti di Gaeta - Gianola e Punta Cetarola - Sperlonga (Figg. 2 e 3).

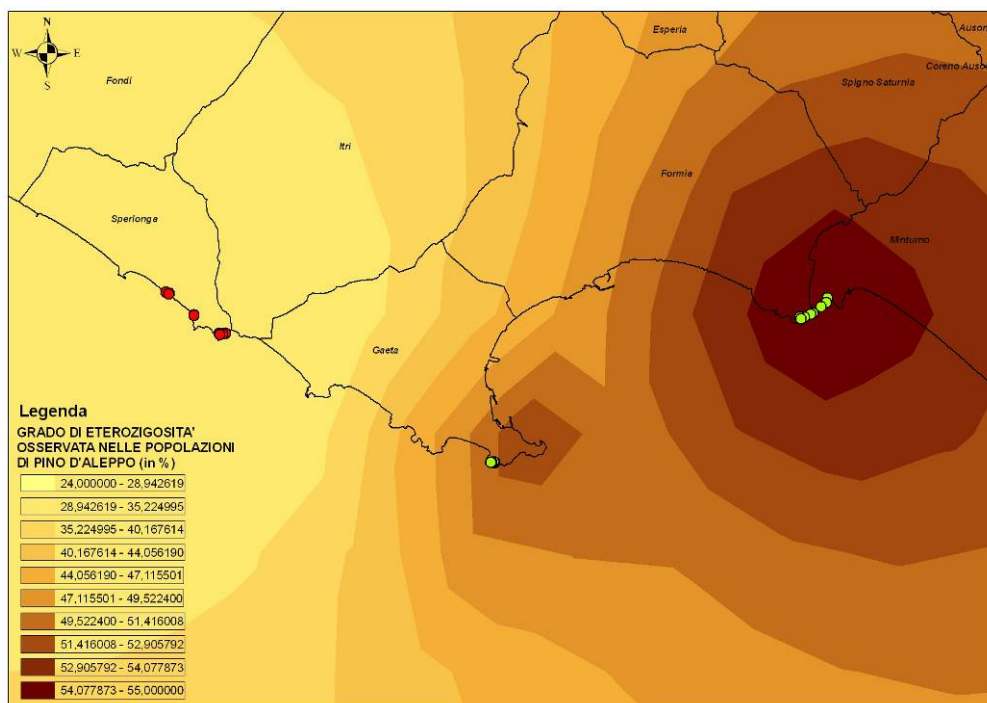


Figura 2 - grado di eterozigotità osservata nelle popolazioni di Pino D'Aleppo (in %) su scala locale

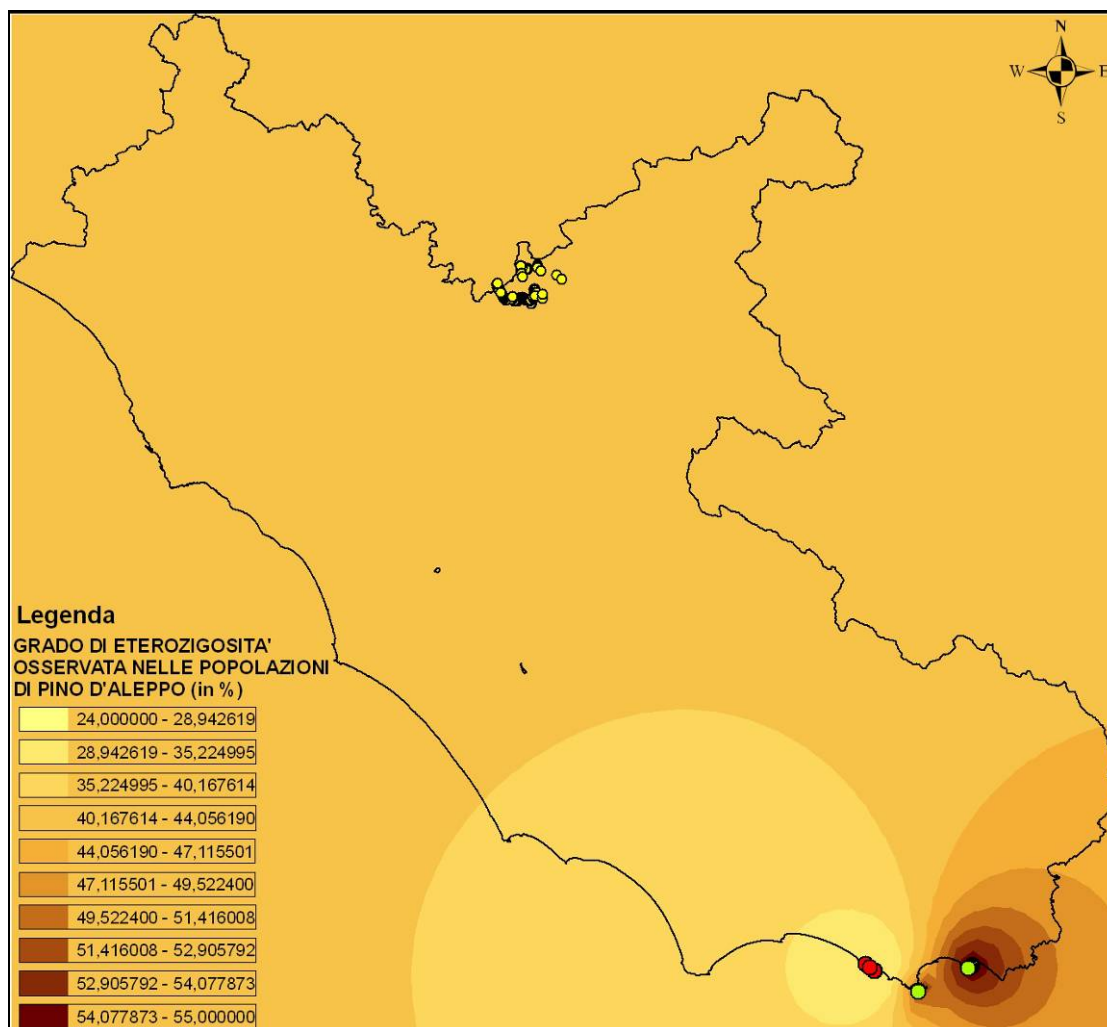


Figura 3 - grado di eterozigotità osservata nelle popolazioni di Pino D'Aleppo (in %) su scala regionale

2 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Il risultato delle analisi effettuate produce due tipi di scenari possibili in riferimento alle popolazioni di Punta Cetarola, Sperlonga-Grotta di Tiberio, rispetto al contesto locale caratterizzato dal marcato e netto segnale di eterozigotità dei popolamenti presenti a Monte Orlando e sul Promontorio di Gianola.

Un primo scenario riguarda possibili introduzioni avvenute in passato di individui di Pino d'Aleppo di origine alloctona, che possano aver determinato un "inquinamento" genetico. Pertanto il segnale di bassa eterozigotità nelle popolazioni localizzate tra Punta Cetarola e Sperlonga può essere ascrivibile a eventi artificiali, con progressiva diminuzione degli individui geneticamente privi di influenze esterne. Si può inoltre facilmente dedurre che gran parte delle operazioni di rimboschimento effettuate in *loco* nel passato, siano state intraprese come attività di recupero post-incendio. D'altronde l'area storicamente è da sempre interessata da frequenti incendi, una volta legati alle attività agropastorali e successivamente originati da eventi occasionali o dolosi.

In particolare ci si riferisce alle aree a monte del Viadotto Bassano in località Monte Bazzano, attualmente interessate a lottizzazioni residenziali.

Il secondo scenario ipotizzato è legato al bassissimo valore di eterozigotità calcolato per il popolamento di Punta Cetarola: l'area non risulta essere caratterizzata da una presenza di individui di Pino reintrodotti artificialmente ne

da un frequente passaggio del fuoco con successiva opera di recupero ambientale post-incendio (rimboschimento).

Inoltre il campionamento, effettuato esclusivamente dagli scriventi, ha interessato solo individui accantonati su falesie e scoscendimenti rupestri esposti a mare, che presentassero diametri di almeno 40 cm, al fine di evitare la raccolta di materiale da individui giovani, come tali sospettabili di una origine da impianto artificiale.

Pertanto il basso valore di eterozigotà registrato può essere giustificato, qualora escludessimo qualsiasi intervento artificiale, solo dall'isolamento a cui è andato soggetto il sito di accantonamento e quindi a un impoverimento genetico causato dal cosiddetto Effetto del fondatore. Si tratterebbe cioè di stirpe derivata da pochissimi o da un solo colonizzatore iniziale. Gli individui di questa stirpe, nucleo locale, portano pertanto con sé solo una piccola parte della variabilità genetica della specie di origine nel suo insieme. In particolare può avvenire la fissazione locale di alleli rari, portati in origine solo da uno o pochi individui, con l'effetto di renderli frequenti e tipizzanti in tutta la nuova popolazione. Questa può quindi differenziarsi per deriva genetica dalla popolazione originale e innescare, con il tempo, anche una differenziazione fenotipica, a lato di una generale scarsa variabilità genetica legata appunto all'esiguo numero dei fondatori d'origine. Il basso valore di variabilità genetica (eterozigotà), sarebbe quindi conferma di autoctonia della popolazione locale di Pino, soprattutto in considerazione di un atteso elevato valore di eterozigotà, data la presenza in zona di numerosi impianti di origine artificiale almeno dal periodo. Ciò è estendibile verosimilmente alla maggior parte degli individui di ambiente rupestre presenti nell'area compresa tra il Viadotto di Bassano e Sperlonga-Grotta di Tiberio.

Ciò implica un evento pregresso di colonizzazione di un sito costiero ad alto dinamismo e quindi instabile nel tempo, da parte di una specie (*P.halepensis*) presente *in loco* da epoche molto più antiche rispetto a ogni influenza umana. Tale considerazione depone a favore quindi di una origine autoctona della popolazione di pino del sito e il carattere relitto della stessa, ipotizzato in precedenza in base alle evidenze di tipo fitogeografico (Spada, 1980).

A supporto di questa ipotesi sul carattere relittuale di nuclei di pino d'Aleppo della zona, nel sito di Punta Cetarola, in ambiente rupestre, poco al di sopra delle stazioni campionate per l'analisi genetica, in condizioni meno soggette all'influenza del mare, si trova accantonata una popolazione di palma nana, *Chamaerops humilis* (Fig. 4). Essa è una dell'ultime testimonianze di una vegetazione subtropicale fini terziaria, vegetazione alla quale apparteneva anche (*P.halepensis*) come aspetto di tipo montano, in quella che nelle epoche successive divenne la geografia dell'Italia peninsulare.



Figura 4 - Individui di *Chamaerops humilis*, Palma Nana in parete in località Punta Cetarola insieme a *Pinus halepensis*

Sulla base di queste indicazioni di tipo genetico e delle considerazioni geobotaniche sul comportamento della specie nell'area, è possibile stabilire che esistono ragioni per riconoscere l'unicità e il valore conservazionistico del genoma locale di *P. halepensis* e le motivazioni a intraprendere azioni di salvaguardia delle popolazioni locali. Gli individui da avviare a coltura ai fini della costituzione di una banca del germoplasma finalizzata alla conservazione di questo genoma, vanno identificati nelle stazioni rupestri dell'area di studio. .

Le raccolte degli strobili debbono essere pertanto eseguite solo sui seguenti individui differenziati per località di provenienza:

1. Promontorio di Gianola, n. schede campionamento Camp. 1-2-3-4-5-6-7-8 (cfr. schede in “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)”);
2. Monte Orlando, n. schede campionamento Camp. 1-2-3-4-5;
3. Punta Cetarola, n. schede campionamento Camp. 1-2-3-4-5.

Si escludono dalle attività della banca del germoplasma tutti gli individui raccolti sia in località Viadotto di Bassano che Grotta di Tiberio, visti i risultati dell'analisi genetica ottenuti sul campionamento effettuato. Ciò non toglie che a seguito di specifiche analisi di monitoraggio, che potranno essere effettuate in futuro, tali aree

possano essere inserite in specifici programmi di conservazione e/o eventuale reintroduzione di ceppi originari di Pino.

3 INDICAZIONI SULLA MESSA A DIMORA DEGLI INDIVIDUI PRESCELTI

Successivamente alla selezione e raccolta degli strobili di *P. halepensis*, si potrà passare alle attività di messa a coltura del seme, secondo le procedure definite dal protocollo prodotto dalla Banca del Germoplasma del Mediterraneo (Dott. Li Vigni – consulente Banca del Germoplasma).

Consecutivamente alla schiusa dei semi raccolti di Pino d'Aleppo e successiva crescita degli individui giovanili (plantule), dovranno essere trasferiti in appositi contenitori all'esterno del laboratorio di crescita della Banca. Questa fase deve provvedere una stretta collaborazione con un vivaio (es. PNR "Monti Aurunci") dove gli individui giovanili, non ancora maturi per una piantumazione in natura, dovranno essere coadiuvati all'accrescimento fin tanto che l'apparato radicale, inizialmente fittonante, non faccia emergere le radici laterali che consentano di prevedere un grado di successo soddisfacente a seguito della messa a dimora in campo.

L'apparato radicale garantirà un elevato grado di "successo" dell'individuo giovane successivamente alla piantumazione nel luogo di origine, visto che ha un grande potere di penetrazione nelle fessure della roccia in profondità, dove troverà un tasso di umidità necessario per lo sviluppo ad adulto.

Molto accurata deve essere la scelta delle aree in cui dovranno essere impiantati i giovanili di pino, aree già indicate alla grande scala dalle precedenti fasi del progetto che in questa fase dovranno essere maggiormente dettagliate.

Sulla base delle indicazioni genetiche e delle prospezioni sulle condizioni topografiche ed edafo-climatiche locali, verranno selezionate delle aree specifiche, di limitata estensione (max 2 metri quadri), dove dovranno essere effettuati dei lavori preparatori di sistemazione del terreno e consolidamento, al fine di garantire il trattenimento di un adeguato tasso di umidità del terreno necessario all'approvvigionamento idrico della specie, non più assistita artificialmente, e ridurre eventuali fenomeni erosivi post impianto per garantire stabilità stazionale necessari alla affermazione del postime. (Fig. 5)

Altrettanto accurato dovrà essere la scelta del periodo in cui effettuare la messa a dimora, al fine di garantire la massima disponibilità idrica, considerando la elevata stagionalità delle precipitazioni locali e le necessità relativamente elevate di umidità al suolo che la rinnovazione di Pino d'Aleppo richiede in condizioni naturali.

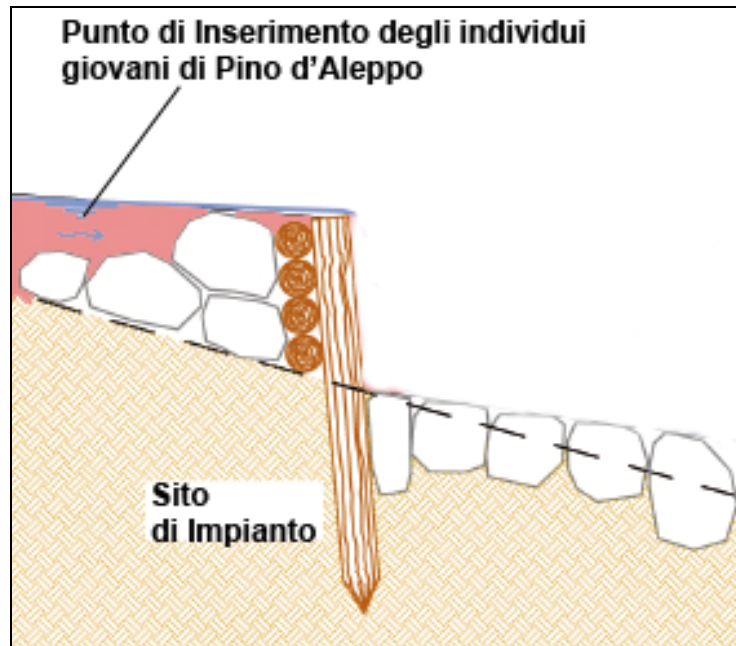


Figura 5 - sito preparato all'impianto del postime

Per la messa a dimora, ad ogni individuo verrà assegnato uno schema di piantagione, in base alle dimensioni massime che questa raggiungerà in età adulta.

Il postime, in parte a radice nuda e/o in parte in fitocella o vasetto, dovrà essere messo a dimora sia manualmente, con l'ausilio del "bastone trapiantatore", sia tramite la trapiantatrice "Berto", laddove gli spazi tra le piante arboree preesistenti *in situ* e il terreno precedentemente preparato lo consentano.

Verrà infine tracciata una planimetria che riporti la localizzazione esatta degli individui messi a dimora, ad uso del Parco Naturale, per consentire una facile identificazione e conservare testimonianza dei siti di messa a dimora nell'ambito del progetto della Banca del Germoplasma..

Oltre alla rappresentazione cartografica si ritiene necessario anche contrassegnare ogni singolo individuo messo a dimora mediante un idoneo sistema di cartellinatura che consenta una veloce e sicura identificazione dell'esemplare.. Tipo, materiale e diciture della cartellinatura andranno studiati in maniera da rendere riconoscibile la filiera del prodotto di origine nel processo di conservazione e nella costruzione della banca dati georiferiti legata alla Banca stessa..

4 MONITORAGGIO

Tutti i siti di piantumazione dovranno essere monitorati nei due anni a seguire al fine di valutare il grado di vitalità degli individui introdotti e la loro adattabilità a condizioni estreme. Pertanto si consiglia di prevedere un elevato numero di individui da reimpiantare, in quanto ad ora non è in alcun modo possibile prevedere quale sia la percentuale di successo. Inoltre si consiglia di mantenere anche in vivaio condizioni ambientali quanto più possibilmente vicine a quelle stazionali del luogo deputato al reimpianto, replicando i tassi di umidità del terreno nel luogo stesso del reimpianto, tenuto conto del fatto che nel vivaio è consigliato tenere tutti gli individui all'aperto già successivamente alle fasi di germinazione e sviluppo della plantula realizzate in serra.

Nei mesi successivi alla messa a dimora degli individui giovanili di Pino d'Aleppo sarà necessario attivare una fase di monitoraggio, a cadenza settimanale, al fine di controllarne la efficienza adattativa alle condizioni dell'ambiente naturale e mantenendo il sito di impianto in un buono stato di conservazione. Nel caso specifico se per necessità legate all'esecuzione dei lavori di reintroduzione in un determinato lasso di tempo, ciò coincidesse con il periodo più caldo dell'anno, meno adatto alla piantumazione di giovani piantine (giugno-agosto), si renderà quantomeno necessario irrigare almeno 1-2 volte alla settimana. L'irrigazione sarà sospesa con l'inizio della stagione autunnale, ovvero con il manifestarsi dei primi rovesci. In generale, solo in casi estremi e per brevi periodi bisognerà provvedere all'irrigazione e deve necessariamente costituire una pratica limitata a condizioni fisico-climatiche particolari, poiché così gli individui della specie sviluppano con maggiore difficoltà una propria resistenza alle condizioni ambientali avverse.

Tutti i siti di piantumazione dovranno essere monitorati nei due anni a seguire al fine di valutare il grado di vitalità degli individui introdotti, l'adattabilità a condizioni estreme e la loro capacità riproduttiva.

Un eventuale insuccesso delle fasi di attecchimento, con successiva morte degli individui in fase di crescita da giovani ad adulti, è molto probabile in quanto nessuna tecnica sperimentata sulla specie, qualora fosse stata mai realizzata, non sarà in grado di fornire risposta a tutte le variabili ambientali possibili, legate ad una reintroduzione in natura.

Pertanto si consiglia di prevedere un elevato numero di individui da reimpiantare, in quanto ad ora non è in alcun modo possibile prevedere quale sia la percentuale di successo e quante sostituzioni di piante morte, con giovani vigorosi tenuti in vivaio, si dovranno effettuare.

Inoltre si consiglia di mantenere le specie in vivaio nelle condizioni più vicine possibili alle condizioni stazionali del luogo deputato al reimpianto, monitorando *in loco* le condizioni meteo-climatiche e cercando di riprodurre tali condizioni in vivaio cercando di replicare l'esposizione o i tassi di umidità del terreno nel luogo del reimpianto, tenuto conto che nel vivaio è consigliato tenere tutti gli individui all'aperto già successivamente alle fasi di germinazione e sviluppo della plantula realizzate in serra. Ciò affinché le piante giovanili possano beneficiare delle stesse condizioni di temperatura e precipitazioni presenti in natura, così come stabilite dall'andamento stagionale del clima, e stabilendo una fase di adattamento alle condizioni presenti nel luogo del reimpianto. Così potrebbe ridursi il numero degli insuccessi di attecchimento degli individui giovani di *Pinus halepensis*.

5 BIBLIOGRAFIA

- Adamovic' L. 1933. Die pflanzengeographische Stellung und Gliederung Italiens. Jena.
- Beguinet A., 1897. Prodromo di una flora dei bacini Pontino ed Ausonio e del versante meridionale dei monti limitrofi. Annali del museo Civico di Storia Naturale di Genova, Serie 2°, vol XVIII.
- Bonaventura G., 1956. Preliminari sulla vegetazione della costiera di Fregane.
- Bonaventura G., 1956. Primo contributo allo studio della flora della costiera di Gaeta. Annali di Botanica, 25(1-2).
- Calamassi, R., M. Falusi and A. Tocci. 1980. Variazione geografica e resistenza a stress idrici in semi di *Pinus halepensis* Mill. *Pinus brutia* Ten. and *Pinus elderica* Medw, Annali dell'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura XI: 195-230.
- Critchfield W.B., Little E.L. jr., 1966. Geographic distribution of the Pines of the world, miscellaneous publication, U.S. Departement of Agriculture, Forest Service n. 991.
- Fenaroli L., 1970. Note illustrative della Carta della Vegetazione reale d'Italia.. Min. Agric. e Foreste Collana Verde n. 28 .
- Gellini R., Grossoni P.. "Botanica Forestale", Voll. I e II, CEDAM, Padova, 1996.
- Giacomini,V; Fenaroli, L. "La flora". Collana "conosci l'Italia", Vol. 2, T.C.I., Milano, 1958.
- Gomez et Al. 2005. Genetic diversity and differentiation of two Mediterranean pines - *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Ait - along a latitudinal cline using chloroplast microsatellite markers. *Diversity and Distribution*, 11: 257-263).
- Jalas, J., Suominen, J. 1972. Atlas Florae Europae, 1 -. Helsinki.
- Piano Di Gestione della ZPS e SIC "Promontorio di Gianola e Monte di Scauri" e del Sic "Rio S. Croce", parte prima – studio generale (2003).
- Pignatti S., 1982 - Flora d'Italia. 3 voll. Edagricole. Bologna.
- Pignatti S., 1998 - I boschi d'Italia. Sinecologia e Biodiversità. UTET.
- Polunin, O., Walters, m.,1987. Guida alle vegetazioni d'Europa. Zanichelli.
- Spada F. 1980. Su alcune stazioni di *Pinus halepensis* Miller. del Litorale Laziale. Acc Lincei Quad.
- Spada F., 1996. "Il paesaggio vegetale del Parco suburbano di Gianola e Monte di Scauri", in "Aspetti archeologici e vegetazionali. Parco Regionale di Gianola e Monte di Scauri". Serie studi e ricerche.

Terracciano N., 1872. Relazione Intorno alle peregrinazioni botaniche fatte per disposizione della Deputazione Provinciale di Terra di Lavoro in certi luoghi della Provincia.

Vendramin et Al 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. . Molecular Ecology, 5: 595-598.

6 GRUPPO DI LAVORO

- *Aspetti Cartografici e Azioni Gestionali - Dott.ssa Laura Casella*
- *Analisi Ecologiche e Geobotaniche - Dott. Emiliano Agrillo*
- *Coordinamento Scientifico, Aspetti Fitogeografici e Filogenetici - Prof. Francesco Spada*