

RIVITALIZZAZIONE DELLA FILIERA VIVAISTICA REGIONALE TOSCANA DI DOUGLASIA PER LA PRODUZIONE DI POSTIME DI QUALITÀ

Maria Cristina Monteverdi, Angela Teani, Roberta Proietti, Leonardo Tonveronachi,
Giovannbattista de Dato, Andrea Germani e Fulvio Ducci

CREA Centro di ricerca Foreste e Legno, Arezzo

Abstract

*To qualify the regional forest nursery chain for the production of Douglas fir planting stock, it is important to **introduce innovation and quality in the Tuscany nursery chain of this species**. Many Douglas fir stands have now reached maturity and their renovation cannot be separated from the **availability of suitable planting material**. Currently the planting stock of Douglas fir is mainly purchased from foreign nurseries, and this does not always guarantee the suitability / adaptability of the planting material in Tuscan environments. For this reason, it is needed to have Forest Reproductive Material (FRM) of **high phenotypic, genetic, and adaptive quality, suitable for the Tuscan territories**. Starting from material selected from the best IUFRO provenances and progenies present in the experimental arboreta of Faltona (AR) and Vallombrosa (FI) managed by CREA and constituting an important germplasm bank at national and international levels, the Do.Na.To project has created two **clonal seed orchards for the conservation of Douglas fir germplasm**. These represent a further step forward in the selection and improvement process of Douglas fir, guarantee the conservation of genetic diversity and given the different planting altitudes, the possibility of verifying the adaptability of the selected origins to the different Tuscan environments. Clonal seed orchards are a tool for the conservation of germplasm and **represent a precious reserve** to be drawn on periodically for seeds, grafts, or cuttings, producing suitable propagation material **for quality mountain arboriculture**. Scions collected from superior phenotypes selected phenotypically and genetically characterized among the best IUFRO provenances and progenies of Faltona and Vallombrosa arboreta were used to clonal seed orchards. They were created on public land managed by the Unions of Mountain Municipalities of Mugello and Pistoia Apennines. These plants will be used both for the conservation of the Douglas fir germplasm and for the medium-long term supply of genetically tested propagation material for our environments.*

Introduzione

In Toscana molti dei soprassuoli di Douglasia sono ormai giunti a maturità e la loro rinnovazione non può prescindere dalla disponibilità di materiale d'impianto idoneo per quest'area. Attualmente il postime di douglasia è acquistato principalmente da vivai esteri e questo non sempre garantisce idoneità /adattabilità del materiale di impianto negli ambienti toscani. Da qui la necessità di disporre di materiale di propagazione di elevata qualità fenotipica, genetica e adattativa, idoneo per questi territori.

A tal fine, il CREA Centro di Ricerca Foreste e Legno, nel contesto del progetto Do.Na.To, ha perseguito l'obiettivo di introdurre innovazione e qualità nella filiera vivaistica della Douglasia in Toscana e nelle tecniche di produzione nelle piantagioni. Questo mediante azioni specifiche: i) individuazione e restauro di materiali di base più idonei per ottenere materiale di propagazione certificato da utilizzare nella filiera vivaistica regionale per la produzione di postime per un'arboricoltura montana di qualità; ii) selezione di fenotipi superiori per caratteristiche fenotipiche e genetico-adattative; iii) caratterizzazione genetica dei fenotipi selezionati per la produzione di materiale di impianto certificato; iv) raccolta di marze dai fenotipi selezionati per la produzione di innesti utili per la creazione di nuovi campi catalogo clonali.

Gli arboreti sperimentali sono uno strumento fondamentale per la conservazione *ex-situ* del germoplasma di specie forestali, che permette di comparare le performance produttive, tecnico-qualitative e adattative di provenienze, discendenze e/o cloni diversi. Riconoscendo il ruolo di questi arboreti sperimentali come fonte sicura di germoplasma di Douglasia, il progetto Do.Na.To ha preso in considerazione le prove comparative di provenienze IUFRO e discendenze di Faltona (AR) e Vallombrosa (FI) realizzati e studiati nell'arco di un secolo dal CREA Centro di ricerca Foreste e Legno (ex Istituto Sperimentale per la Selvicoltura-ISSA; DUCCI

F. e TOCCI A., 1989). Essi costituiscono una banca di germoplasma unica da cui poter raccogliere materiale di propagazione certificato per realizzare nuovi campi catalogo clonali con lo scopo di conservare germoplasma selezionato e fornire materiale di propagazione certificato.

I nuovi campi catalogo rappresentano un ulteriore passo avanti nel processo di selezione e miglioramento della douglasia, garantendo la conservazione della diversità genetica e, date le diverse quote di impianto, la possibilità di verificare l'adattabilità delle provenienze selezionate ai diversi ambienti toscani. La produzione clonale può sembrare a prima vista incompatibile con il mantenimento di alti livelli di diversità; tuttavia, con una quantità sufficiente di genotipi inseriti nel catalogo, la variabilità può essere anche superiore a quella di una normale piantagione di semenzali. In questo modo, si possono bilanciare gli aspetti tecnico-produttivi (qualità del legno e accrescimenti) con la conservazione di un adeguato livello di diversità genetica e di resilienza dell'impianto. Rappresentano, inoltre, una preziosa riserva a cui attingere periodicamente per semi, innesti o talee, producendo materiale di propagazione idoneo per un'arboricoltura montana di qualità.

Per questo scopo, il CREA, in collaborazione con l'Unione dei Comuni Montani del Casentino e il Reparto Carabinieri Biodiversità di Vallombrosa (AR), ha pianificato un restauro degli arboreti clonali e ha realizzato interventi colturali nelle aree sperimentali di Faltona (AR) e Vallombrosa (FI) (parcella sperimentale di Spedalunga) mediante diradamento geometrico. Sono stati effettuati rilievi dendro-auxometrici, fenotipici, e analisi genetiche, che hanno permesso di selezionare e caratterizzare i fenotipi superiori per caratteristiche tecnico-produttive e adattative migliori per gli ambienti toscani. Da questi sono state raccolte le marze utilizzate per la produzione di 800 innesti, destinati ai due nuovi cataloghi clonali. I campi catalogo sono stati realizzati in collaborazione con Unione dei Comuni Montani del Mugello e dell'Appennino Pistoiese su terreni pubblici da loro gestiti. Questi impianti saranno utilizzati sia per la conservazione del germoplasma della douglasia che per l'approvvigionamento a medio-lungo termine di materiale di propagazione geneticamente testato per i nostri ambienti.

Caratterizzazione Adattativa del materiale selezionato - Monitoraggio fenologico

Al fine di caratterizzare il materiale selezionato a livello adattativo, è stato effettuato un monitoraggio fenologico su talee in ambiente controllato dei genotipi scelti per gli innesti, al fine di valutare la capacità adattativa e di resilienza ai cambiamenti climatici del materiale selezionato. Il monitoraggio fenologico in cella climatica riduce la variabilità ambientale consentendo di ottenere risultati più precisi. Per il monitoraggio sono state osservate 5 talee/genotipo x 60 genotipi selezionati per gli innesti.



Figura 1. Scheda punteggio Monitoraggio fenologico per la Douglasia secondo il protocollo n. 83 – Protocol for assessment of bud break and bud set in *Pseudotsuga menziesii* (in Ducci et al., 2012). Punteggi relativi alle diverse fasi fenologiche osservate: 1 = Gemme racchiuse da perule, aghi non visibili; 2 = le perule iniziano ad aprirsi; le punte dell'ago sono visibili ma ancora ricoperte dalla membrana; 3 = gli aghi si estendono fino a due volte la dimensione della gemma, sono ancora stretti in un fascio; 4 = gli aghi iniziano a separarsi e il germoglio si ingrandisce. Il giovane germoglio sembra un pennello; 5 = il germoglio si ingrandisce ancora; la lunghezza del germoglio raddoppia rispetto alla fase 4; 6 = gemma apicale chiusa. Germogli morbidi con aghi completamente sviluppati.

Le talee sono state poste all'interno di camere di crescita controllate e sottoposte, dopo un breve periodo di acclimatamento, a due regimi di temperatura diversi (21-22 °C e 15 -18° C) e con un fotoperiodo di 16h luce/8h buio. Il monitoraggio fenologico è stato eseguito mediante un metodo di valutazione basato su una scala di punteggio con 6 valori (da fase 1 = gemma apicale chiusa, a fase 6 = fine dell'allungamento del germoglio; Fig. 1), secondo il protocollo TreeBreedex (European project). Da una prima analisi preliminare

le provenienze più meridionali (Mercurella - Italia) sono più precoci nella fase fenologica di schiusura delle gemme sia a basse che alte temperature di circa 13-15 giorni rispetto alle altre provenienze (USA). La maggiore precocità nell'apertura delle gemme spesso è correlata a una stagione di crescita più lunga e quindi una maggiore produttività, ma nello stesso tempo espone di più le piante alle gelate tardive, a cui la Douglasia è molto sensibile.

Analisi genetiche per la caratterizzazione degli individui selezionati

Dai fenotipi selezionati sono state prelevate le gemme apicali vitali. Da circa 10 gemme per ogni individuo sono stati prelevati i meristemi, da cui è stato estratto il DNA. Il materiale genetico è stato estratto mediante kit di estrazione commerciale, DNeasy Plant mini-kit, QIAGEN. L'esito dell'estrazione è stato valutato tramite misurazione spettrofotometrica. I campioni estratti sono poi stati sottoposti ad amplificazione PCR (Polymerase Chain Reaction), con l'utilizzo di primer microsatelliti nucleari (SSR), specifici per *Pseudotsuga menziesii* reperiti in bibliografia (Tab.1, SLAVOV et al., 2003). I prodotti di PCR sono stati poi sottoposti ad analisi di frammento tramite sequenziatore capillare, al fine di determinare un profilo genetico univoco per ogni singolo individuo (Fig.2). Tali profili permetteranno di certificare la provenienza del materiale di moltiplicazione che verrà prodotto dai campi catalogo.

Locus	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Repeat motif	Optimal T _a °C (tested range)	N ^a	A ^b	Allele size (bp)
PmOSU_1C3	CTCCCCTCCAGATTTTACTC	TGGCGTAACAAATAAGAGAAA	(TC) ₂₅ (AC) ₃₂ ...(TC) ₄	57 (55-57)	28	28	166–232
PmOSU_1F9	CCTCATGCATTGGCACTC	GGATTCTTGAGCAGGTAGG	(AG) ₃₄	55 (52–57)	35	33	201–319
PmOSU_2C3	AAAGACAACATTATGAAAGG	GTAATGGTTCGAAAAATAATG	(TC) ₂₄ (AC) ₁₈	50 (48–51)	35	25	163–251
PmOSU_2G12	CAAGGACTCATATGGGAAA	AACATCAGTAATAACCTTTT	(AC) ₁₁ ...(AC) ₁₉ ...(GCAC) ₅(GCAC) ₄ (AC) ₇ ...(AC) ₆	51 (48–51)	34	16	244–310
PmOSU_3D5	GGCATCCTATTTTCATTTT	GTGATTACCTAACTTGTC	(TG) ₁₆ (AG) ₂₆	50 (48–51)	35	19	125–193
PmOSU_4A7	TTGTAAAAATCCCATGTAT	AAGTGGGGAGTGTGTAAT	(TG) ₅ ...(TG) ₅ ...(CG) ₇ (TG) ₄(TG) ₂₉ ...(ATC) ₅	48 (48–54)	34	30	196–340
PmOSU_783f	GAGCTGATGCCTGAAGACT	CAAGTCAGTTCACAATTCCT	(AT) ₅ ...(AT) ₅	57 (56–59)	33	15	205–303

Tabella 1 - Elenco dei primer SSR utilizzati nell'indagine

La prima analisi effettuata sui fenotipi superiori identificati per la raccolta delle marze non ha permesso di definire una chiara struttura di popolazione del bosco. Per tale motivo è stato effettuato un ulteriore e più esteso campionamento con 20 individui per provenienza, le cui analisi sono in fase di elaborazione. Tale analisi permetterà di definire con maggiore completezza la struttura genetica della popolazione oggetto di studio.

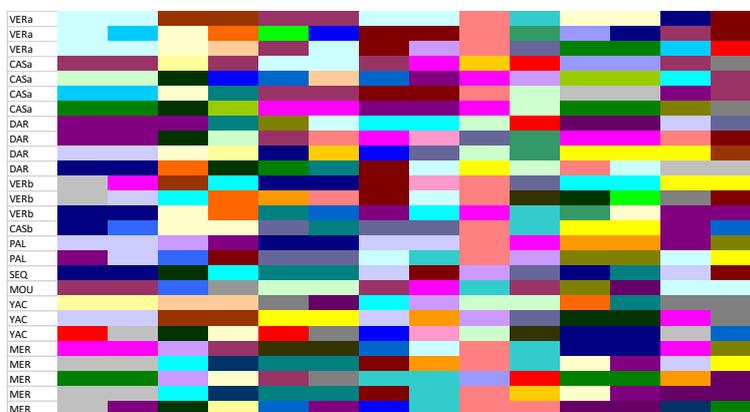


Figura 2 - Profili genetici degli individui analizzati. Ogni colore corrisponde ad un allele

Attraverso ricerca bibliografica sono stati individuati e selezionati geni correlati alla qualità del legno relativi a diverse specie di conifere. Dalle sequenze dei geni annotati su genoma di *Picea glauca* (LAMARA et al., 2015), sono state ricercate le omologhe su genoma di Douglasia (HOWEN et al, 2013; George et al., 2021)

e su tali porzioni di DNA sono stati poi isolati i marcatori a singolo polimorfismo (SNP). Su 31 geni isolati e trovati omologhi sono stati individuati 81 SNP successivamente testati su 21 campioni di riferimento. L'analisi è stata effettuata tramite tecnica KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) che permette attraverso marcatura fluorescente di discriminare la presenza o meno dell'allele mutato.

Tra gli 81 SNP testati, 40 hanno mostrato capacità di amplificazione e sono risultati polimorfici (Fig. 3). Gli SNP isolati verranno messi in correlazione con dati fenotipici e climatici al fine di definire marcatori in grado di individuare anche in fase di selezione precoce genotipi con una performance produttiva e adattativa migliore.

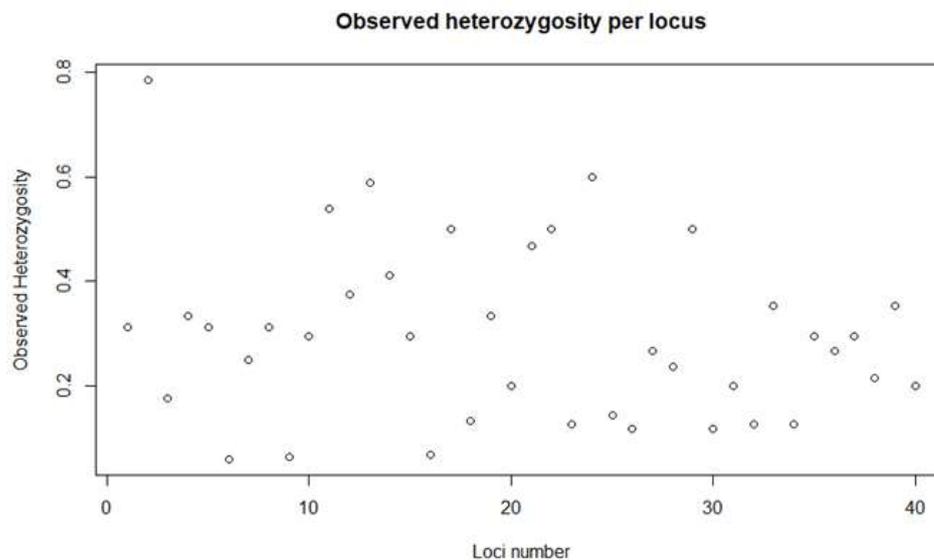


Figura 3 - Prospetto dei livelli di eterozigosi ottenuti dai singoli SNP

Bibliografia

- DUCCI F. e TOCCI A., (1989). *Primi risultati della sperimentazione IUFRO 1969-70 su Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco nell'Appennino centro-settentrionale*, Annali Istituto sperimentale per la Selvicoltura Vol. XVIII – 1987.
- DUCCI F., DE CUYPER B., PÂQUES L.E., PROIETTI R., WOLF H., (2012). *Reference protocols for assessment of trait and reference genotypes to be used as standards in international research projects*, Ed. CRA SEL - Arezzo, Italy: p. 82. ISBN: 978-88-901923-6-4.
- GEORGE J.P., SCHUELER S., GRABNER M., et al., (2021). *Looking for the needle in a downsized haystack: Whole-exome sequencing unravels genomic signals of climatic adaptation in Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii)*, Ecol Evol. 11: pp. 8238–8253 <https://doi.org/10.1002/ece3.7654>.
- HOWE G.T., YU J., KNAUS B., CRONN R., KOLPAK S., DOLAN P., LORENZ W.W., DEAN J.F., (2013). *A SNP resource for Douglas-fir: de novo transcriptome assembly and SNP detection and validation*. BMC Genomics 14: p 137 doi:10.1186/1471-2164-14-137.
- LAMARA M., RAHERISON E., LENZ P., BEAULIEU J., BOUSQUET J. and MACKAY J. (2016). *Genetic architecture of wood properties based on association analysis and co-expression networks in white spruce*, New Phytol, 210: pp. 240-255 <https://doi.org/10.1111/nph.13762>.
- SLAVOV G.T., HOWE G.T., YAKOVLEV I. et al. (2004). *Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations*, Theor Appl Genet 108: pp. 873–880 <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1490-y>.