



**“PROGETTAZIONE E PRIME AZIONI PER LA VALORIZZAZIONE DELLA VIVAISTICA REGIONALE”**

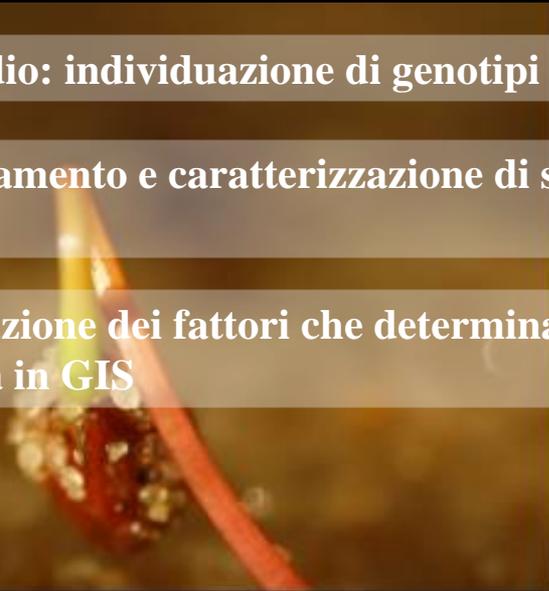
1. Fitorimedio: individuazione di genotipi da utilizzare nella fitodepurazione

2. Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione *ex situ*.

3. Individuazione dei fattori che determinano la distribuzione tartuficola e ricostruzione cartografica in GIS

Gruppo di lavoro

Gabriella S. Scippa  
Marco Marchetti  
Roberto Tognetti  
Gherardo Chirici  
Paolo Di Martino  
Paolo D'Andrea  
Maria Scarano  
Massimo Paolanti



**Decontaminazione o stabilizzazione *in situ* di suoli degradati con piante e microrganismi associati, in alternativa ai tradizionali sistemi basati su reazioni chimiche**

Vantaggi:

1. basso impatto ambientale,
2. bassi costi di realizzazione,
3. produzione di biomassa,
4. elevata valenza paesaggistica,
5. nessuna manodopera specializzata.

## Fitorimedia: individuazione di genotipi da utilizzare nella fitodepurazione

Species	Water Source or Contaminant
<i>Populus</i> spp. (poplar, cottonwood)	Petroleum hydrocarbons, landfill leachate, chlorinated solvents, MTBE, municipal wastewater, and pesticides
<i>Salix</i> spp. (willow)	Petroleum hydrocarbons, municipal wastewater, and landfill leachate
<i>Eucalyptus</i> spp., <i>Tamarix</i> spp.	Hydraulic control, high arsenic
<i>Acer rubrum</i> (red maple)	Landfill leachate
<i>Pinus radiata</i> D. Don, (Monterey pine)	Municipal wastewater
<i>Morus rubra</i> (red mulberry)	PAHs
<i>Thespesia populnea</i> (milo) and <i>Prosopis pallida</i> (kiawe)	Petroleum hydrocarbons



- Rapido accrescimento
- Elevate produzioni di biomassa
- Genoma relativamente piccolo
- Trasformazione semplice
- Facile propagazione
- Alti tassi traspiratori



# Multifunzionalità

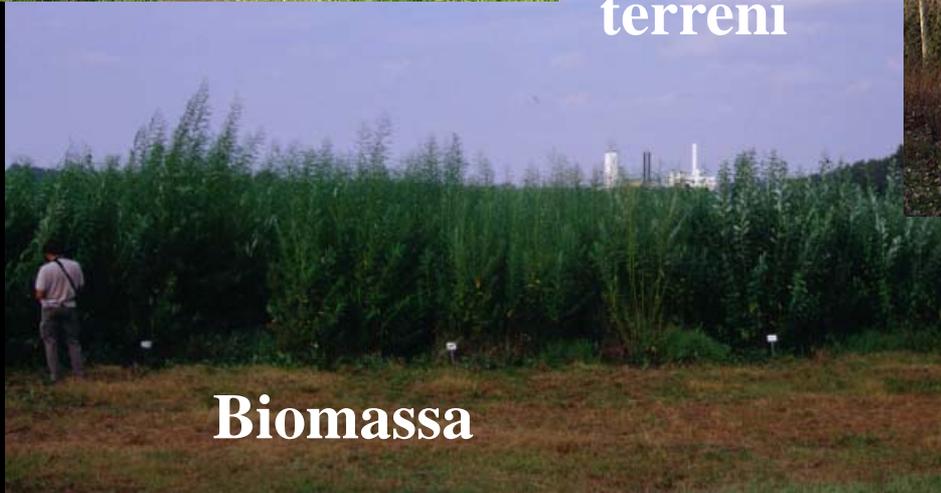
## Fitorimedia



Stabilizzazione  
terreni



**Biodiversità**



**Biomassa**

Specie forestali (roverella) governate a ceduo possono essere indicate per la fitostabilizzazione di terreni variamente contaminati, laddove per motivi pedo-climatici non è possibile utilizzare specie a rapido accrescimento.



# Fitorimedia: individuazione di genotipi da utilizzare nella fitodepurazione

**Obiettivo:** individuazione di specie legnose con elevata capacità detossificante da utilizzare in programmi di fitorimedia.

**Metodo:** approccio multidisciplinare integrando analisi ecofisiologiche, molecolari, chimiche e morfologiche, per:

- a) studiare in ambiente controllato la risposta di specie forestali al contaminante ;
- b) verificare la capacità d'intercettazione del contaminante;
- c) cercare polimorfismi in geni utili per il fitorisanamento;
- d) studiare la rizosfera nel sistema contaminato;
- e) selezionare genotipi specifici da impiegare in futuri test di pieno campo.

**Specie :** diversi cloni di pioppo , *Populus deltoides* cv Lux e *Populus nigra* cv Nigra poli , e una specie legnosa autoctona, *Quercus pubescens* Willd

## *Metodi*

La sperimentazione è stata condotta in serra, presso il Dipartimento STAT dell'Università degli Studi del Molise, a marzo 2007, a regime idrico controllato e in condizioni di temperatura e fotoperiodo naturale.





35 semenzali di provenienza certificata (Molise) di roverella (*Quercus pubescens* Willd.) di 2 anni ottenuti dal Vivaio di Campochiaro (Regione Molise) trapiantati in vasi da 12 L con sabbia:argilla:torba (30:50:20 in peso) a pH 6-7.



60 talee di pioppo: 30 del clone Lux (*Populus deltoides*), 30 del clone Nigra poli (*Populus nigra*) trapiantati in vasi da 12 L. contenenti sabbia, argilla, torba (70:20:10 in peso), pH6-7.

## Metodi

Durante il periodo di crescita per evitare lisciviazione di nutrienti:  
500 ml di H<sub>2</sub>O/vaso per il pioppo e  
500 ml di H<sub>2</sub>O ogni due vasi per la roverella.

Fertilizzazione delle piante, con fertilizzante commerciale a lento rilascio, dopo 10 giorni dalla messa a dimora.



**Tre mesi dopo dalla messa a dimora è stato effettuato il trattamento con solfato di cadmio**

## TRATTAMENTO CON IL SOLFATO DI CADMIO ( $\text{CdSO}_4$ )

Per ogni clone di pioppo è stata utilizzata una di  $\text{CdSO}_4$  pari a  $50\text{mgKg}^{-1}$  p.s. del suolo e  $150\text{mgKg}^{-1}$  p.s. del suolo

e per la roverella è stata utilizzata una di  $\text{CdSO}_4$  pari a  $25\text{mgKg}^{-1}$  p.s. del suolo e  $75\text{mgKg}^{-1}$  p.s. del suolo

*Controllo: 10 vasi contenenti suolo nudo è stato trattato con le stesse soluzioni utilizzate per le piante*

**Durata del Trattamento : 12 settimane**

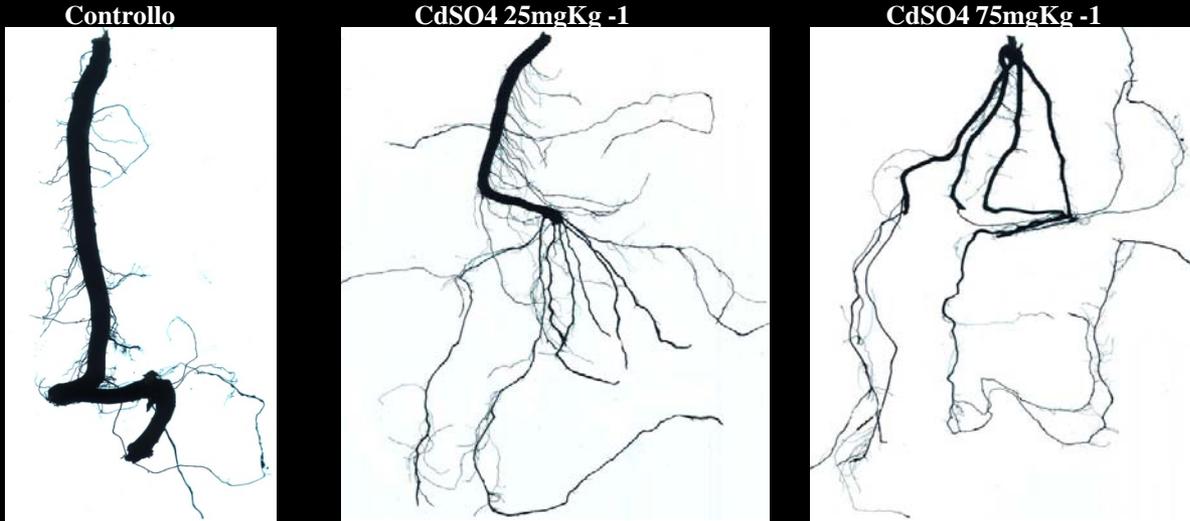


# Risultati

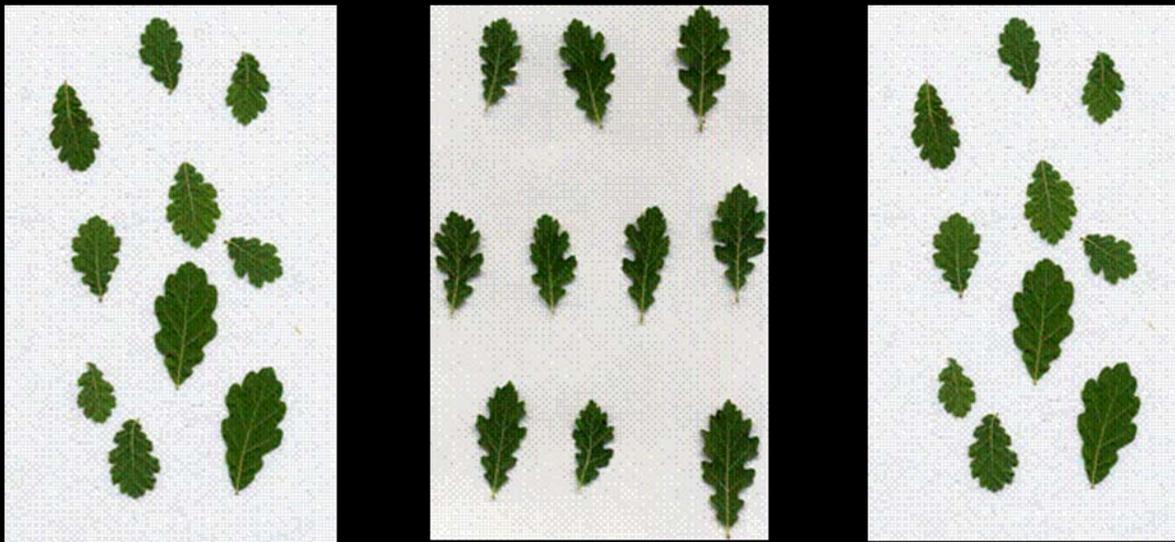
Trattamenti Cd				
Parametri fotosintetici	0	25 mg kg <sup>-1</sup> p.s.	75 mg kg <sup>-1</sup> p.s.	P-value (ANOVA)
$A_{\text{sat}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	11.54±0.94	7.53±0.22	3.76±0.42	*
$R_{\text{day}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	2.14±0.22	2.48±0.18	2.38±0.19	
$\Gamma_{\text{comp}}$ ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	7.81±0.38	9.71±0.38	12.41±0.72	*
$V_{\text{cmax}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	44.24±2.17	34.88±1.73	23.94±1.22	*
$J_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	133.32±14.53	94.71±6.11	58.82±3.39	*
TPU ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	7.32±0.59	6.91±1.08	6.44±2.50	
$C_i/C_a$	0.79±0.02	0.77±0.02	0.72±0.02	
$J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$	2.99±0.20	2.71±0.05	2.46±0.07	
$g_s$ max ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.29±0.04	0.17±0.02	0.09±0.01	*
$I_a$ (%)	33.89±1.65	40.48±1.39	45.86±1.88	*
$F_v/F_m$	0.83±0.01	0.76±0.02	0.65±0.07	
$\Delta F/F'_m$	0.82±0.00	0.74±0.06	0.54±0.08	
$q_p$	0.83±0.01	0.76±0.02	0.68±0.06	

## *Analisi morfologica*

Aumento del numero di radici secondarie in funzione dell'aumento di concentrazioni di Cd rispetto al controllo.



Apparato fogliare non mostrava sintomi di necrosi, clorosi e di leaf rolling, in funzione dell'aumento delle concentrazioni.



## Metodi

L'analisi chimica è stata eseguita nel laboratorio di Pedologia della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi del Molise. I campioni relativi alla parte vegetale sono stati divisi per trattamento e separati in foglie, fusto e radici.

## Risultati

Bioaccumulo	Trattamento			
	0.0	25	75	P-VALUE
	g kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	
FOGLIE	0,00	1.95±0.43	3.41±0.72	0.0140
FUSTO	0,00	2.46± 1.18	2.97±2.22	0.7118
RADICI	0,00	3.33± 1.75	4.56±3.46	0.5606
TOTALE	0,00	7.74	10.94	

### Coefficiente di Bioaccumulo

25 mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	1.8 mg kg <sup>-1</sup> p.s.
75 mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	1.1. mg kg <sup>-1</sup> p.s.

### Fattore di traslocazione

25 mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	0.58 mg kg <sup>-1</sup> p.s.
75 mg kg <sup>-1</sup> p.s. suolo	0.74 mg kg <sup>-1</sup> p.s.

**Conclusioni:** Dai risultati ottenuti, le risposte ecofisiologiche sono risultate migliori al trattamento con inquinante alla concentrazione finale più bassa e ciò suggerisce la sua adattabilità in suoli moderatamente contaminati ed in particolare in siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale.

**Roverella fitostabilizzante**

## **Analisi molecolare**

**L'analisi molecolare è finalizzata alla valutazione e /o individuazione di eventuali fattori genetici coinvolti nella risposta della pianta allo stress da metallo pesante, e quindi negli eventuali meccanismi di tolleranza: **metallotionine****

**Super famiglia di proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare ricche in cisteine che chelano metalli.**

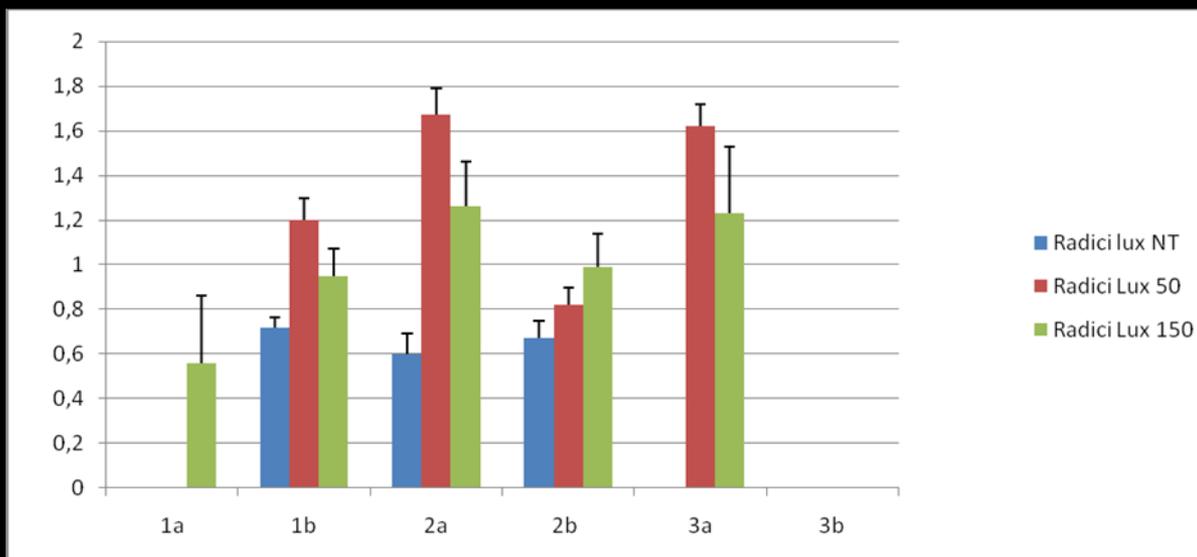
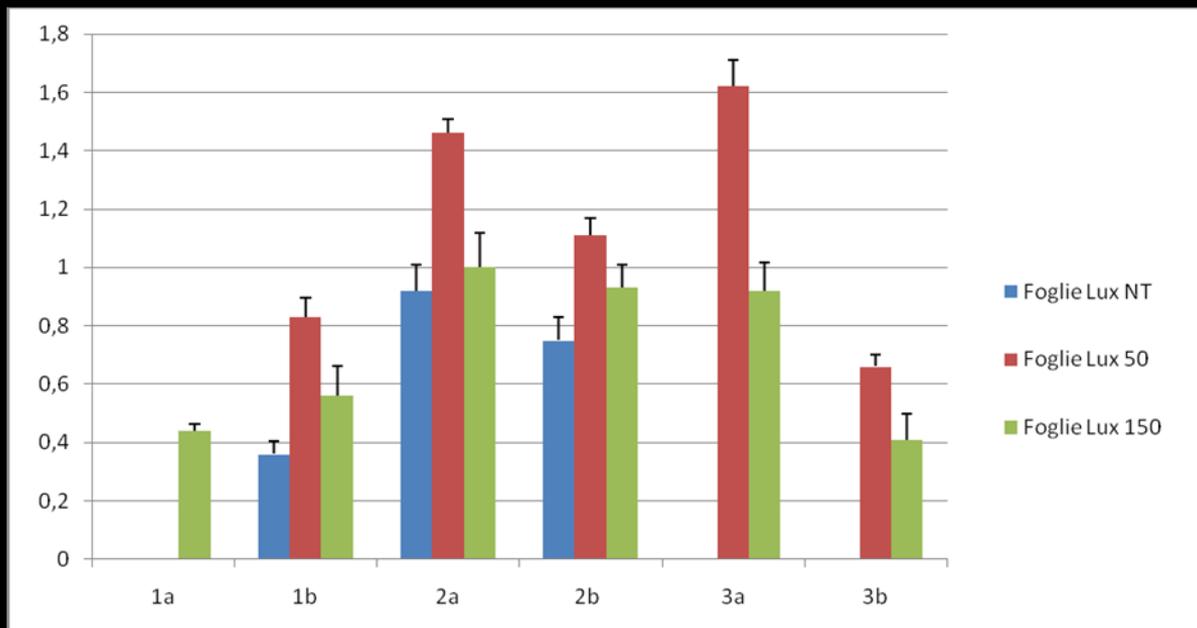
**Sono proteine coinvolte nel processo di sequestrazione e compartimentazione dei metalli pesanti/fitotossici (eventualmente assorbiti dal terreno) (Di Baccio, Kopriva, Sebastiani and Rennenberg, 2005) in loci dove questi possono essere resi innocui o comunque produrre effetti meno deleteri (vacuolo citoplasmatico, parete cellulare)**

La disponibilità di informazioni bibliografiche sulle sequenze dei geni codificanti delle metallotionine ha facilitato l'individuazione dei primers da utilizzare negli esperimenti di RTPCR nel caso del pioppo .

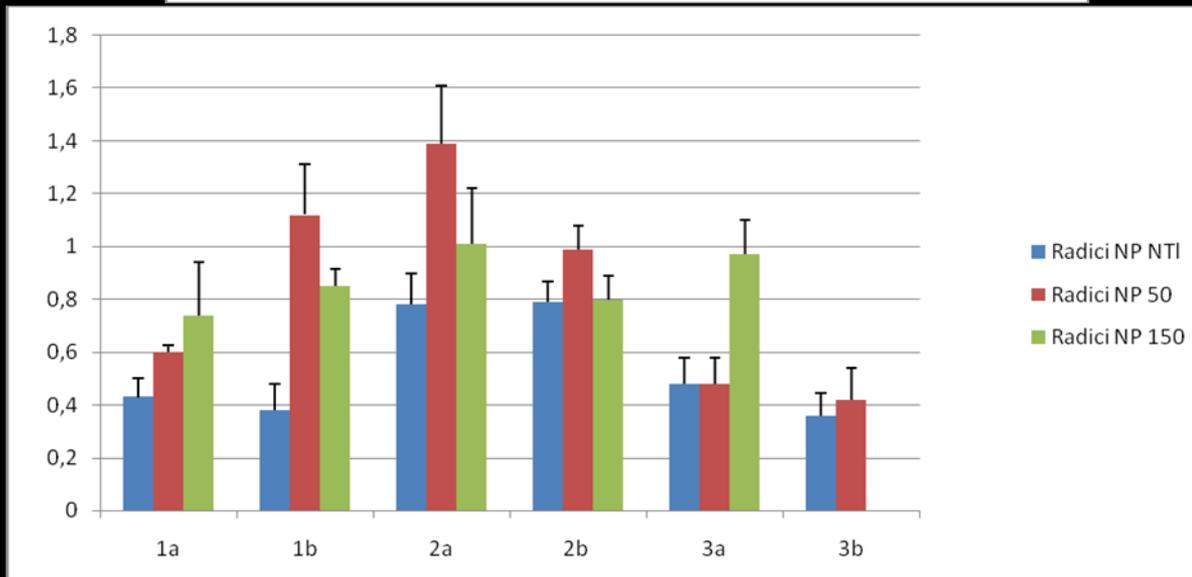
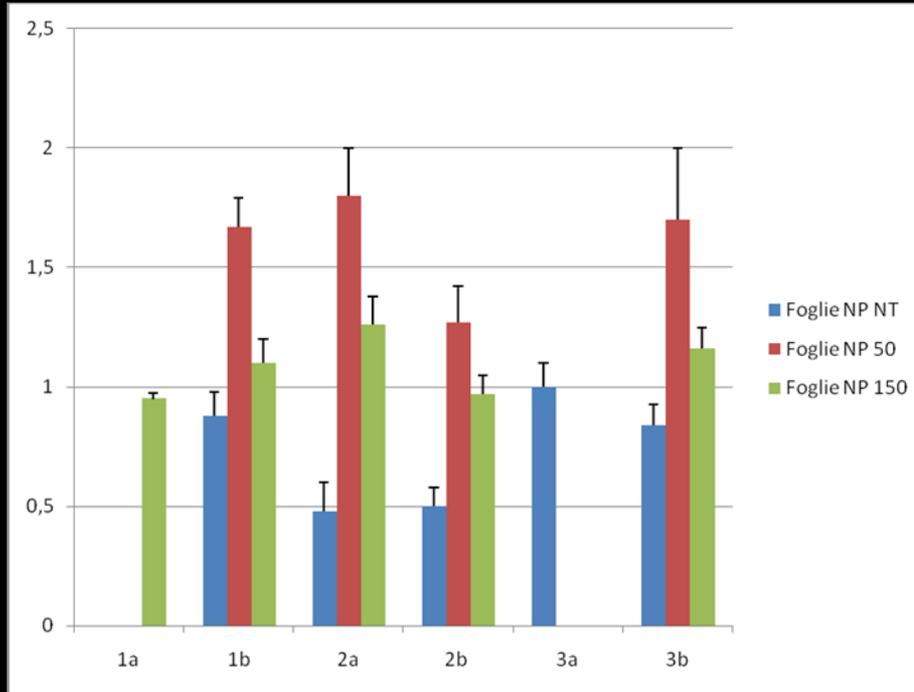
Le indagini con PCR semiquantitativa sono state effettuate con 6 coppie di primer (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b) che amplificano i geni codificanti le metallotioneine del pioppo. Come gene housekeeping è stato utilizzato un frammento di Beta tubulina comune a parecchie specie vegetali (*Populus* incluso). La quantificazione dell'induzione è stata rapportata all'espressione del gene housekeeping utilizzato come controllo di espressione in ogni set di esperimenti.

VARIETA	<i>Populus deltoides</i> Lux	<i>Populus nigra</i> Nigra poli (Np)	<i>Quercus pubescens</i> abb. (Qp)
[mg/ml] di Nitrato di Cadmio all'interno della soluzione utilizzata per il trattamento	50 – 150 – Acqua o Non trattato	50 – 150 – Acqua o Non trattato	50 – 150 – Acqua o Non trattato
Porzione di tessuto prelevato	Foglie apicali, mediane e basali, Radici	Foglie apicali, mediane e basali, Radici	Foglie apicali, mediane e basali, Radici

# Populus deltoides



# Populus nigra



**Conclusioni:** dalla comparazione dei differenti patterns di induzione si evince che le due specie di pioppo inducono differenti classi di MT a differenti condizioni di induzione e, di conseguenza, una diversa percezione dello stress da metalli pesanti.

I risultati ottenuti dalle analisi a livello molecolare indicano che il pioppo (per le cultivars considerate) in risposta alla presenza di metalli pesanti nel substrato potrebbe attivare meccanismi di difesa coinvolti nella detossificazione. Tali differenze sono propedeutiche all'utilizzo pratico di questi cloni.

# Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione *ex situ*.

Costituzione di una banca del germoplasma per la conservazione *ex situ*, la caratterizzazione e propagazione sessuale di specie forestali autoctone

## Finalità

1. conservare la biodiversità forestale del territorio, fornire germoplasma autoctono per programmi di reintroduzione, rispristino, riforestazione, recupero ambientale
2. Studiare meccanismi coinvolti nel controllo della dormienza e identificare protocolli di propagazione da seme
3. A questa attività si affianca la Gene Bank

## Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione ex situ.

La raccolta dei semi è stata eseguita seguendo il protocollo del manuale di campo redatto dalla Millenium Seed Bank (MSBP) dei Royal Botanic Gardens di Kew, U.K. (<http://www.rbgekew.org.uk./sedbank/msb.html>).

### Allegato III: MSB COLLECTION DATA FORM

Date Collected		Collection no	
Collector(s)			
<b>SITE DATA</b>			
Country			
Province/State			
Local Situation			
Latitude:		GPS used (YES/NO).	
Longitude:		If no, see over	
Altitude:		GPS Datum WGS84	or
<b>HABITAT DATA</b>			
Habitat Code			
Habitat and Assoc. Species			
Modifying Factors			
Land Form			
Land Use		Slope°	
Geology		Aspect	
Soil Colour		Soil pH	
Soil Texture		Drainage	
<b>COLLECTION DATA - If collection has been verified, please see over.</b>			
Family			
Genus			
Species			
Infra-specific			
No. of Voucher Duplicates		Area sampled (m2)	
No. of Plants Sampled		% population producing seed	
No. of Plants Found			
Seed Harvesting (early, mid, late season) Please circle			
Seeds Collected from (plants, ground, both)			
State of seeds (moist, dry, both, other)			
<b>HERBARIUM DATA</b>			
Plant Habit Tree Shrub Liana Erect herb Creeping herb Climbing herb		Plant Height (m)	
Other descriptors			
<b>ETHNOBOTANICAL DATA</b>			
Vernacular name		Language	
Use - please circle.	Food Food	Additive Animal	Food Bee Plant Invertebrate food
Materials	Fuel Social Use	Vertebrate Poison	Non-Vertebrate Poison
Medicine	Environmental Use Gene	Source	



## 2. Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione ex situ.

• *Abies alba*

• *Fagus sylvatica*

• *Hypericum perforatum*

• *Ligustrum vulgare*

• *Juniperus communis* (Ginepro comune)

• *Juniperus macrocarpa*

• *Prunus spinosa*

• *Quercus pubescens*

• *Quercus cerris*

• *Ruscus aculeatus*

• *Sorbus aria*

• *Taxus baccata*

• *Sorbus aucuparia*

• *Viburnum lantana*



## 2. Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione ex situ.

**Pulizia:** i semi sono stati disarticolati dai frutti o dalle infruttescenze, sono state quindi eliminate le impurità residue come polveri, residui resinosi, semi vuoti o abortivi, semi compromessi da insetti e/o intaccati e quindi non conservabili. La pulizia è stata fatta manualmente e mediante l'uso di opportuni setacci



ImageTool

File Edit Annotation Stacks Plug-Ins Analysis Processing Script Settings Window Help

Mean  
Std. Dev.

Mean	Std. Dev.
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	

Find Objects

Draw a polygon around the region that you wish ImageTool to search.

**Parametri morfologici**

- Area (mm<sup>2</sup>)
- Perimetro (mm)
- Asse maggiore (mm)
- Asse minore (mm)
- Rotondità
- Colore del tegumento
- Pattern del tegumento
- Colore del pattern del tegumento
- Colore dei cotiledoni

x=63 y=783 v=255

Caps Num | Play | Calibrated | Overwrite

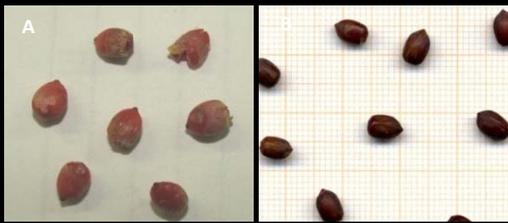
## 2. Campionamento e caratterizzazione di semi specie legnose autoctone per la conservazione ex situ.

**Test di vitalità:** metodo colorimetro ai Sali di tetrazolio (TTC)

### **Disidratazione:**

I semi ortodossi sono stati lasciati a temperatura ambiente (23-25°C) e umidità 10-15% in camera di essiccazione per circa 1 mese

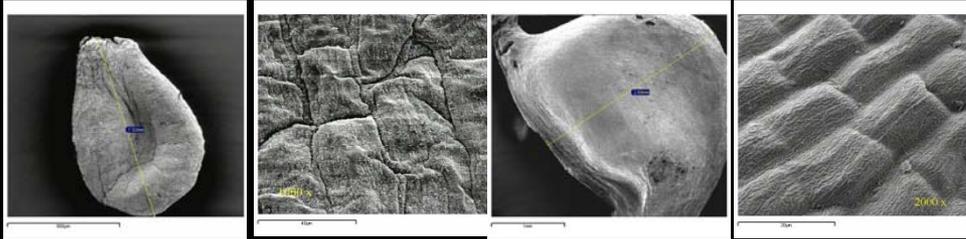
**Conservazione:** I semi vengono conservati a freddo (T -20°C) in contenitori perfettamente ermetici, e trasparenti per monitorare l'umidità presente al loro interno. Il controllo dell'umidità nel contenitore viene effettuato attraverso un indicatore (es.: gel di silice)



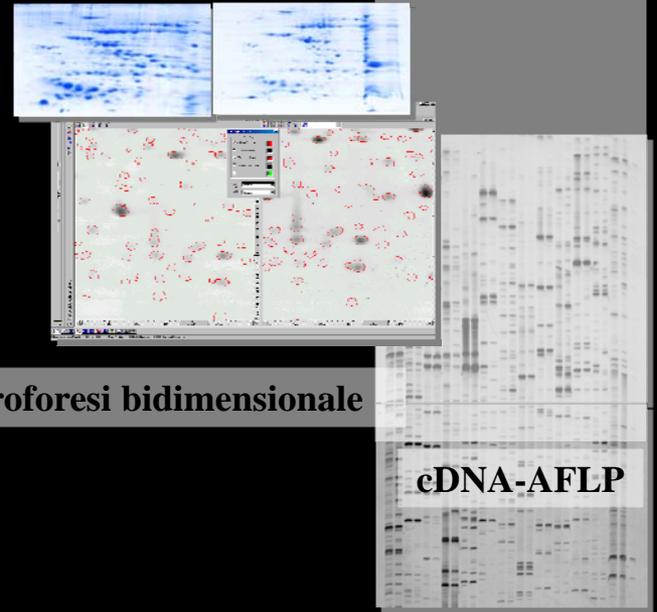
**Figura 4:** test colorimetrico ai sali di tetrazolio per valutare la vitalità dei semi. A) semi vivi B) controllo semi



*Thlaspi stylosum*:



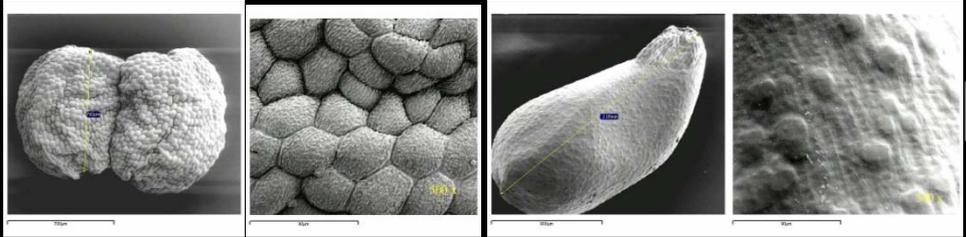
*Ranunculus pollinensis*:



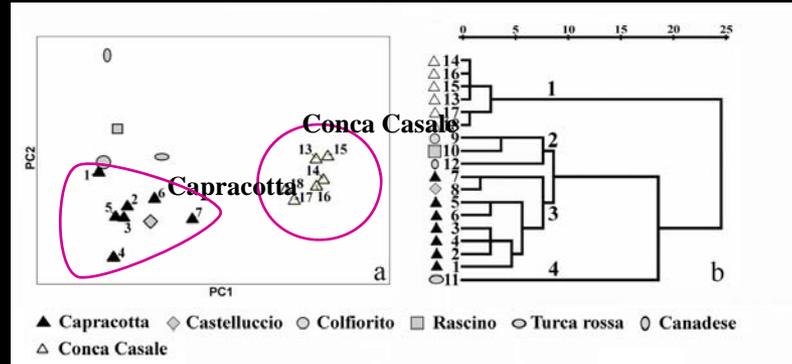
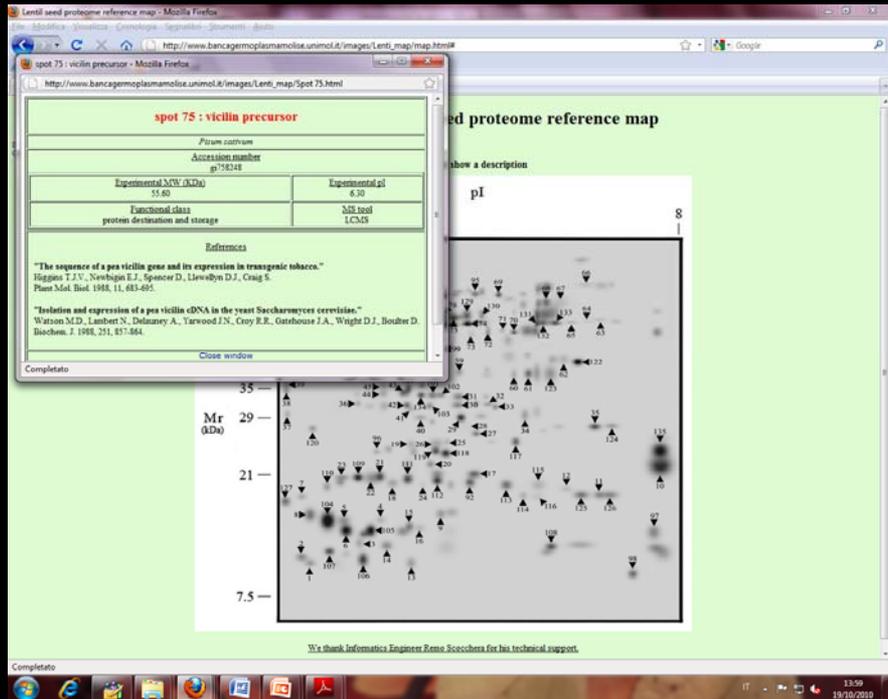
Elettroforesi bidimensionale

cDNA-AFLP

*Galium magellense*:



*Viola eugeniae*:



Tutte le informazioni raccolte in campo e in laboratorio sono state inserite nel database in access della Banca del Germoplasma del Molise

Modulo di gestione dati per la Banca del Germoplasma del Molise. Contiene campi per identificazione (nome, numero), dati colturali (area, popolazione), dati morfologici (foglie, frutti), dati fenologici (fioritura, maturazione), e dati di conservazione (seme, frutto).

Informazioni generali:  
ID progressivo: [ ] Data ingresso: 20/07/2018 Data Operatore: Mario Scaramo, Daniela De Angelis  
Nome: [ ] N°: [ ]  
Località: [ ] Data popolazione: [ ] Razza/da: [ ] Habitat raccolto: [ ]  
Uso: [ ]  
Nome raccoglitore: [ ] Tipo di materiale raccolto: [ ] Materiale prodotto: [ ]  
Data di appartenenza: [ ]  
Progetto: [ ] Area coltivata (sq): [ ] Area popolazione (sq): [ ]  
Micropopolazione: [ ] Democrazia (sq): [ ]  
Materiale prodotto: [ ]  
Proprietà del materiale: [ ]  
Data e ora di raccolta: [ ]  
Importanza (1-5): [ ] Qualità relativa (1-5): [ ]  
Prevalenza autoctona (0/1/2/3): [ ]  
Condizioni colturali: [ ]  
Metodo di conservazione: [ ]  
N° individui presenti: [ ]  
Numero di semi per frutto: [ ]  
Numero di semi per individuo: [ ]  
Numero di semi raccolti per individuo: [ ]  
Numero di individui sul quale è stata effettuata la raccolta: [ ]  
Percentuale di popolazione produttiva semi: [ ]  
Note: [ ]

Stato del seme: [ ]  
N° anni prima del taglio: [ ]  
% nella pianta: [ ]  
Data semi formati: [ ]  
Discriminazione: [ ]  
Inferenza o dati colt.: [ ]  
Produzione legumi: [ ]  
Stato e natura di conservazione: [ ]  
Condizioni filoclastate popolazione: [ ]  
Stato conservazione popolazione: [ ]  
Materie e fertilità di consumo: [ ]  
Pia-tuttamenti: [ ]  
Maturità raccolta: [ ]  
Necessaria ricerca raccolto: [ ]  
Necessaria riprova (per altre situazioni): [ ]

Stato di conservazione: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]

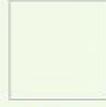
Foto pianta:  Foto fiore:   
Foto frutto:  Foto seme: 

Modulo di gestione dati per la Banca del Germoplasma del Molise. Contiene campi per identificazione (nome, numero), dati colturali (area, popolazione), dati morfologici (foglie, frutti), dati fenologici (fioritura, maturazione), e dati di conservazione (seme, frutto).

Informazioni generali:  
ID progressivo: [ ] Data ingresso: 20/07/2018 Data Operatore: Mario Scaramo, Daniela De Angelis  
Nome: [ ] N°: [ ]  
Località: [ ] Data popolazione: [ ] Razza/da: [ ] Habitat raccolto: [ ]  
Uso: [ ]  
Nome raccoglitore: [ ] Tipo di materiale raccolto: [ ] Materiale prodotto: [ ]  
Data di appartenenza: [ ]  
Progetto: [ ] Area coltivata (sq): [ ] Area popolazione (sq): [ ]  
Micropopolazione: [ ] Democrazia (sq): [ ]  
Materiale prodotto: [ ]  
Proprietà del materiale: [ ]  
Data e ora di raccolta: [ ]  
Importanza (1-5): [ ] Qualità relativa (1-5): [ ]  
Prevalenza autoctona (0/1/2/3): [ ]  
Condizioni colturali: [ ]  
Metodo di conservazione: [ ]  
N° individui presenti: [ ]  
Numero di semi per frutto: [ ]  
Numero di semi per individuo: [ ]  
Numero di semi raccolti per individuo: [ ]  
Numero di individui sul quale è stata effettuata la raccolta: [ ]  
Percentuale di popolazione produttiva semi: [ ]  
Note: [ ]

Stato del seme: [ ]  
N° anni prima del taglio: [ ]  
% nella pianta: [ ]  
Data semi formati: [ ]  
Discriminazione: [ ]  
Inferenza o dati colt.: [ ]  
Produzione legumi: [ ]  
Stato e natura di conservazione: [ ]  
Condizioni filoclastate popolazione: [ ]  
Stato conservazione popolazione: [ ]  
Materie e fertilità di consumo: [ ]  
Pia-tuttamenti: [ ]  
Maturità raccolta: [ ]  
Necessaria ricerca raccolto: [ ]  
Necessaria riprova (per altre situazioni): [ ]

Stato di conservazione: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]  
Stato di conservazione del germoplasma: [ ]

Foto pianta:  Foto fiore:   
Foto frutto:  Foto seme: 

Banca del Germoplasma in collaborazione con  
l'Erbario del Molise e il laboratorio di Biologia Vegetale



**FOREST GENE BANK**

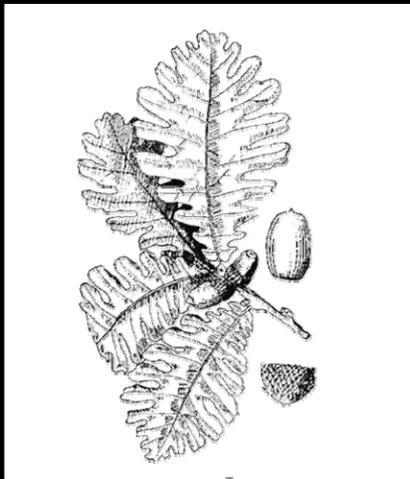
## Scopi principali della “Forest Gene Bank”:

- Realizzazione di un archivio del DNA di specie forestali autoctone che raccolga, oltre ai dati di tipo genetico-molecolare, anche dati di tipo biologico, ecologico e storico;
- Realizzazione di un sistema di scambio tra Gene Bank a livello nazionale e internazionale;
- Collegamento a progetti Nazionali e Internazionali (es. CBOL – Consortium for the Barcode of Life) per la caratterizzazione, la genotipizzazione e la messa a punto di protocolli standardizzati nell’identificazione delle specie;
- Conservazione dell’informazione genetica per scopi di ricerca scientifica;
- Caratterizzazione genetica e certificazione del germoplasma da utilizzare reintrodurre;
- Creazione di una collezione di campioni caratterizzati morfologicamente e conservati Presso il Museo Erbario e la Banca del Germoplasma di Pesche e di specie presenti presso il Giardino di Capracotta;

**Attualmente sono presenti circa 800 campioni appartenenti a popolazioni di Quercus di provenienza sia italiana - Monte Vairano, Simbruini, Aurunci - che straniera – Austria caratterizzati sia geneticamente che morfologicamente**

Analisi biomolecolare di specie simpatriche del sottogenere *Quercus* al fine di:

- Analizzare il grado di differenziazione genetica tra le specie;
- Valutare la ripartizione della biodiversità a livello inter- e intra-specifico;
- Caratterizzare il genotipo degli individui;
- Stimare il grado d'ibridazione tra le specie.



*Q. frainetto*



*Q. petraea*



*Q. pubescens*

# Individuazione dei fattori che determinano la distribuzione tartuficola e ricostruzione cartografica in GIS

Cartografia dell' idoneità potenziale della Regione Molise

In corso la realizzazione di una cartografia operativa a livello provinciale

