



Do.Na.To.
Douglasiete Naturali Toscane

CONVEGNO FINALE
Gruppo Operativo Do.Na.To
Douglasiete Naturali Toscane

Firenze, 22 Giugno 2022 - Accademia dei Georgofili

Rivitalizzazione della filiera vivaistica regionale toscana di Douglasia per la produzione di postime di qualità (WP6)



M. Cristina Monteverdi
CREA Centro di ricerca Foreste e Legno



Regione Toscana





Obiettivi:

Qualificare la filiera vivaistica regionale per la produzione di postime di douglasia certificato per un'arboricoltura montana di qualità.

Introdurre innovazione e qualità nella filiera vivaistica della Douglasia in Toscana e nelle tecniche di produzione nelle piantagioni.

Come fare?

- Individuare e restaurare i 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;
- Selezionare fenotipi superiori per caratteristiche fenotipiche e genetico-adattative;
- Caratterizzare geneticamente i fenotipi selezionati per la produzione di materiale di impianto certificato;
- Raccogliere marze dai fenotipi selezionati per la produzione di innesti utili per la creazione di nuovi campi catalogo clonali per la conservazione del germoplasma e per avere materiale di propagazione qualificato.

Il progetto Do.Na.To ha preso in considerazione le prove comparative di discendenze e provenienze IUFRO di Faltona (AR) e Spedalinga-Vallombrosa (FI) come 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.



FASE 1 - RESTAURO PARTICELLE SPERIMENTALI COMPARATIVE DI PROVENIENZE IUFRO E DISCENDENZE DI DOUGLASIA FALTONA-AR

(obiettivi 1-2-3: Attività da 1.1 a 1.5)

ATTIVITÀ PREVISTE	STATO
Progettazione del restauro delle prove di progenie di discendenze di douglasia . Attività 1.1 ; 1.2; 1.4; 1.5	✓ FATTO
Selezione preliminare al taglio, tra le migliori discendenze, di 60 fenotipi superiori . Attività 1.2; 1.4.	✓ FATTO
Martellata di diradamento dei test compartivi di provenienze IUFRO e di discendenze di Douglasia. Attività 1.1; 1.2	✓ FATTO
Misurazione con metodo per sezioni degli alberi abbattuti con il diradamento Attività 1.3	✓ FATTO
Raccolta marze per la produzione di innesti. <u>Attività 1.4</u>	✓ FATTO
Raccolta del materiale vegetale per la caratterizzazione genetica del materiale da impiegare nella costituzione dei campi catalogo. Attività 1.5	✓ FATTO



N. pianta	Progenie ID	Blocco	diametro (cm)	H (m)
1	1	H	41.8	33
2	2	L	37	33
3	2	A	41	35.2
4	2	E	33.8	35.5
5	4	I	37.1	33
6	4	A	24.1	25.6
7	4	A	43	25.4
8	4	A	44.1	38
9	5	A	36.8	25.6
10	5	A	43.4	29
11	6	I	36.6	31
12	7	L	47.4	28.5
13	7	B	40.6	33.4
14	7	A	41.3	36.4
15	8	I	38.1	35
16	8	I	41	32.8
17	8	H	35.8	31.3
18	8	H	38.8	34
19	9	I	37.6	26
20	9	A	42	26
21	9	A	36.9	32.56
22	9	A	35.8	28
23	10	L	32.8	31.9
24	10	L	33.2	22.6
25	10	E	48.6	38.7
26	11	H	38.1	28
27	11	I	54.1	31.2
28	11	I	40	28
29	12	I	47.4	26
30	13	I	32.8	34

N. pianta	Progenie ID	Blocco	diametro (cm)	H (m)
31	13	H	31	31.3
32	13	C	38.8	31
33	16	A	32.3	28.2
34	18	A	39.5	35.1
35	19	L	34	33.5
36	19	A	36.4	35.1
37	19	E	37.6	32.3
38	3	G	24.7	22.5
39	5	G	15.3	25.3
40	2	G	19.1	26.4
41	6	G	14.3	24.5
42	5	G	22.3	30.6
43	14	G	24.2	31
44	13	G	19.4	26
45	19	G	18.9	27.6
46	14	G	22.3	29.7
47	6	G	18.3	27.5
48	6	G	18.9	30
49	17	G	22.9	29.8
50	6	G	19.1	29.1
51	18	G	23.1	30.2
52	20	G	17.0	32
53	16	G	21.7	26.5
54	11	G	19.4	32
55	16	G	26.3	27.4
56	7	G	17.4	19.4
57	7	G	19.3	24.7
58	12	G	11.9	27.2
59	11	I	21.5	31
60	1	L	18.2	33.2

SUPPORTO, ORGANIZZAZIONE E SUPERVISIONE DELLA PRODUZIONE DI 800 INNESTI PER LA REALIZZAZIONE DEI CAMPI CATALOGO. (Attività 1.4)



A causa della parziale sospensione delle cure colturali durante il lockdown dovuto al COVID 19 di marzo-aprile 2020 la fase di innesto del materiale d'impianto è in larga misura fallito per ovviare a ciò e poter realizzare i campi catalogo è stato effettuato un nuovo prelievo di marze ed una nuova campagna di innesti (aprile 2021), con l'impiego di marze raccolte da fenotipi selezionati tra le migliori provenienze IUFRO dalla particella sperimentale di Spedalinga (Vallombrosa - FI).

RESTAURO PARTICELLA SPERIMENTALE COMPARATIVA DI PROVENIENZE IUFRO DI SPEDALINGA (VALLOMBROSA - FI) (replica Attività 1.4)

ATTIVITÀ PREVISTE	STATO
Progettazione del restauro delle prove di provenienze IUFRO. Attività 1.1 ; 1.2; 1.4; 1.5	✓ FATTO
Selezione di fenotipi superiori, tra le migliori provenienze IUFRO. Attività 1.2; 1.4.	✓ FATTO
Martellata di diradamento dei test compartivi di provenienze IUFRO . Attività 1.1; 1.2	✓ FATTO
Raccolta marze per la produzione di innesti. <u>Attività 1.4</u>	✓ FATTO
Raccolta del materiale vegetale per la caratterizzazione genetica e adattativa del materiale da impiegare nella costituzione dei campi catalogo. Attività 1.5	✓ FATTO





❑ Realizzazione di 800 nuovi innesti con materiale selezionato raccolto nella particella sperimentale comparativa di provenienze IUFRO di Spedalinga Vallombrosa (FI).

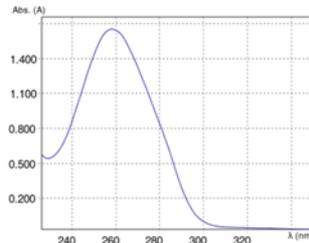
L'attività è stata svolta in collaborazione con il Reparto Carabinieri Biodiversità di Vallombrosa (FI)



CARATTERIZZAZIONE GENETICA E ADATTATIVA DEI CLONI PROPAGATI PER INNESTO. (Attività 1.5)

ANALISI GENETICHE PER LA DETERMINAZIONE DEGLI INDICI DI VARIABILITA'

- 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, mediante kit di estrazione commerciale (DNeasy Plant mini-kit, QIAGEN).



Materiale genetico di qualità ottimale:
Concentrazione ~190 ng/ul
 $A_{260}/A_{280} > 1.60$

Per ottenere gli indici di variabilità genetica sono state eseguite Amplificazione con marcatori SSR specifici per *Pseudotsuga menziesii* selezionati in letteratura (SLAVOV et al., 2003 – Tab 1).

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.

Tabella 1. Elenco dei primer SSR utilizzati nell'indagine

Locus	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Repeat motif	Optimal T_m , °C (tested range)	N^a	A^b	Allele size (bp)
PmOSU_1C3	CTCCCTCCAGATTTTACTC	TGGCGTAACAAATAAGAGAAA	(TC) ₂₅ (AC) ₁₂ ...(TC) ₄	57 (55-57)	28	28	166-232
PmOSU_1F9	CCTCATGCATTGGACACTC	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	GGCATCCATTTTTCATTTT	GTGATTACCTAACTTGTGC	(TG) ₁₆ (AG) ₂₆	50 (48-51)	35	19	125-193
PmOSU_4A7	TTGTA AAAAATTC CCAATGTAT	AAGTGGGGAGTGTGTAAT	(TG) ₅ ...(TG) ₅ ...(CG) ₇ (TG) ₄(TG) ₂₉ ...(ATC) ₅	48 (48-54)	34	30	196-340
PmOSU_783f	GAGCTGATGCCTTGAAGACT	CAAGTCAGTTCACAATTCCT	(AT) ₅ ...(AT) ₅	57 (56-59)	33	15	205-303

SELEZIONE DI MARCATORI QUALITATIVI (SNP) ASSOCIATI ALLA QUALITÀ DEL LEGNO

A partire da uno studio di associazione genetica (GWAS) effettuata su *P. glauca* sono stati individuati 20 geni associati alla qualità del legno in 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).



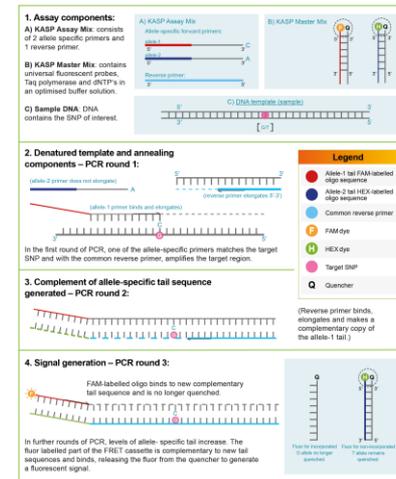
Genetic architecture of wood properties based on association analysis and co-expression networks in white spruce

Mebarek Lamara¹, Elic Raberorn¹, Patrick Lenz^{1,2}, Jean Beaulieu^{1,2,3}, Jean Bousquet^{1,2} and John MacKay^{1,4}

¹Forest Research Centre, and Institute for System and Integrative Biology, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada; ²Canadian Wood Fibre Centre, Canadian Forest Service, Natural Resources Canada, Québec, QC G1V 4C7, Canada; ³Canadian Research Chair in Forest and Environmental Genetics, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada; ⁴Department of Plant Sciences, University of Oxford, Oxford, OX1 3BG, UK

GenBank accession number	Cluster ID ¹	Gene name ²	Degree ³	Rank ⁴	Functional annotation
BT102049	GG0165_B14	NAC-7*	50	1	NAC-domain transcription factor, NAC-007
BT108136	GG03117_F18	MYB8*	40	2	MYB domain protein
BT117295	GG03818_K09	SIR4A	42	2	Serine hydroxymethyltransferase 4
BT109520	GG03209_H09	DUF579	41	3	Protein of unknown function
BT111350	GG03236_C10	FRB-2*	41	3	Flavininid reductase 2
BT116706	GG03805_C07	DMS-2*	40	4	3-deoxy-ox-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase
BT118944	GG04012_D01	Unknown	39	5	Protein of unknown function
BT102121	GG0166_H10	LPTMCS-*	38	6	Lysophospholipase 2
BT106709	GG03008_L07	GATL7	38	6	Galacturonosyltransferase-like 7
BT106091	GG02902_M04	PK	37	7	Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolyase-like domain
BT106204	GG02904_O19	DUF 716	37	7	Protein of unknown function
BT100489	GG03009_M04	RING1A-like	37	7	RING1A-box superfamily protein
BT101152	GG0103_F19	TRN_Like	37	7	Tetrahydropteridase repeat domain-containing protein
BT101192	GG0072_B14	PR	34	8	Pathogenesis-related thaumatin-like protein
BT106820	GG03011_C09	AAAF5-1	34	8	Atrial natriuretic-associated protein 05-1
BT105990	GG02830_C18	K202	33	9	IQ-domain 2
BT106875	GG03012_K10	LRR-PR	33	9	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
BT117203	GG03816_M01	SEP	33	9	SUBSTRATE-like serine endopeptidase family protein
BT116853	GG03807_P11	LRR	32	10	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
BT102883	GG03113_H22	MYB*	31	11	MYB domain protein

SNP selection KASP assay



- Individuazione di contig con presenza di polimorfismi a singola base (SNP) sui geni ortologhi: TOTALE 733
- Selezione di SNP sufficientemente lunghi e idonei all'analisi: TOTALE 81 successivamente testati su 21 campioni di riferimento.
- Sintesi di saggi KASP per l'analisi degli SNP sugli individui selezionati: individuazione della variante allelica tramite saggio a chemioluminescenza.
- Associazione fra variabilità dello SNP e caratteri fenotipici di accrescimento (altezze e diametri).



Do.Na.To.
Douglasiete Naturali Toscana

CONVEGNO FINALE
Firenze, 22 Giugno 2022 - Accademia dei Georgofili



FASE 2 – REALIZZAZIONE DI DUE CAMPI CATALOGO IN CONVENZIONE CON L'UNIONE COMUNI APPENNINO PISTOIESE E L'UNIONE DEI COMUNI MONTANI DEL MUGELLO

ATTIVITÀ PREVISTE	STATO
Verifica e caratterizzazione stazionale dei siti scelti per la realizzazione dei campi catalogo. (ATTIVITA' 2.1)	✓ FATTO
Progettazione del disegno sperimentale di due campi catalogo e assistenza per la progettazione. (ATTIVITA' 2.3)	✓ FATTO
Verifiche sulla vitalità e sopravvivenza degli innesti fino a fine progetto. (ATTIVITA' 2.4)	✓ IN PROGRESS
Monitoraggio fenologico in ambiente controllato. (ATTIVITA' 2.5)	✓ FATTO
Partecipazione ad attività di Progetto e divulgative. (ATTIVITA' 1.6; 2.6)	✓ FATTO

MONITORAGGIO FENOLOGICO X LA CARATTERIZZAZIONE ADATTATIVA DEL MATERIALE SELEZIONATO (Attività 2.5)

Monitoraggio fenologico di talee in ambiente controllato dei genotipi scelti per gli innesti è stato effettuato al fine di valutare la capacità adattativa e di resilienza ai cambiamenti climatici del materiale utilizzato per i campi catalogo.

Il monitoraggio fenologico in cella climatica riduce la variabilità ambientale consentendo di ottenere risultati più precisi.

Schema sperimentale

5 talee/genotipo x 60 genotipi selezionati per gli innesti

5 talee/genotipo x 35 genotipi selezionati per gli innesti

Condizioni delle due camera di crescita

- Temperature 21-22 °C e 15 -17° C
- fotoperiodo di 16h luce - 8h buio

Metodo di valutazione: scala di punteggio con 6 valori (da fase 1 = gemma apicale chiusa, a fase 6 = fine dell'allungamento del germoglio) secondo il protocollo TreeBreedex (European project).



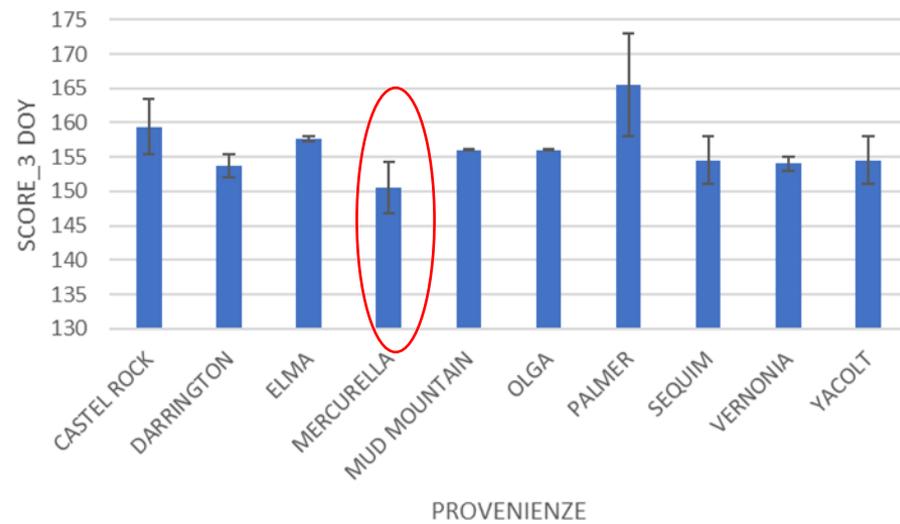
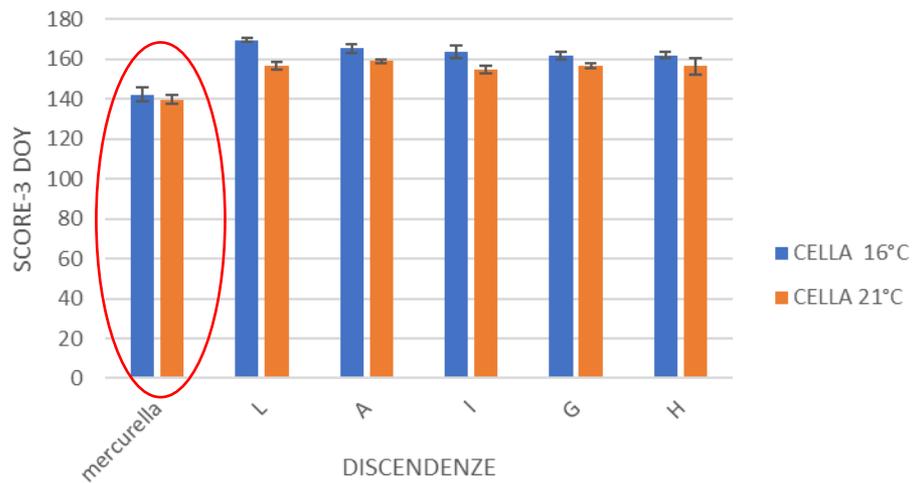


SCHEDA PUNTEGGIO MONITORAGGIO FENOLOGICO X DOUGLASIA

Protocollo nr. 8.3 - PROTOCOL FOR ASSESSMENT OF BUD BREAK AND BUD SET IN *PSEUDOTSUGA MENZIESII*. In: Ducci F., De Cuyper B., Pâques L.E., Proietti R., Wolf H. (Compilers), 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



SEQUENZA FASI FENOLOGICHE OSSERVATE



Conclusioni

- ❑ 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. Per questo è fondamentale la loro conservazione e gestione nel lungo periodo.
- ❑ Gli arboreti sperimentali 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.
- ❑ I campi catalogo clonali 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. Materiale certificato.

GRUPPO DI LAVORO RISORSE GENETICHE FORESTALI CREA CENTRO DI RICERCA FORESTE E LEGNO

- GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

