



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale (*ordinamento
ex D.M. 270/2004*)
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

La biologia della riproduzione:
Test di germinazione su semi
di *Populus nigra*

Relatore

Ch. Prof. Gabriella Buffa

Correlatore

Dr. Sergio Pasquini

Laureando

Alessio Tommasi
Matricola 823030

Anno Accademico

2013 / 2014

Sommario

Indice

1.Introduzione	2
1.1 Strategie di conservazione	4
1.1.1 Conservazione <i>Ex situ</i>	4
1.1.2 Banche del germoplasma	4
1.2 Il seme; struttura e caratteristiche	6
1.2.1 La germinazione	7
1.2.2 Differenti comportamenti in base al contenuto di umidità	12
1.3 <i>Populus nigra</i>	15
1.3.1 Raccolta, estrazione e pulizia dei semi	17
1.3.2 Conservazione	18
1.3.3 Germinazione	19
2.Materiali e Metodi	21
2.1 Campionamento	21
2.1.1 Campionamento <i>Populus nigra</i>	23
2.2 Test di purezza specifica	24
2.3 Peso di 1000 semi	26
2.4 Test di umidità	27
2.5 Preparazione e spedizione dei campioni	30
2.5.1 Preparazione delle buste	30
2.5.2 Preparazione dei campioni	31
2.6 Test di germinazione	33
2.6.1 Test di germinazione su <i>Populus nigra</i>	40
3.Risultati e Discussione	44
3.1 Peso di 1000 semi	44
3.2 Test di purezza specifica	45
3.3 Test di umidità	46
3.4 Test di germinazione	47
4.Conclusioni	49
Bibliografia	
Appendice	

1. INTRODUZIONE

La consapevolezza dell'importanza della biodiversità si è sviluppata negli ultimi decenni, inizialmente con il report della Commissione mondiale sull'ambiente e lo sviluppo del 1987 (Commissione Brundtland) dove venne introdotto il concetto di sviluppo sostenibile e in seguito nel 1992, con la sottoscrizione della Convenzione sulla Diversità Biologica. Questo trattato fornisce una definizione precisa di diversità biologica: "La variabilità degli organismi viventi di qualsiasi fonte, inclusi, tra l'altro, gli ecosistemi terrestri, marini e gli altri ecosistemi acquatici e i complessi ecologici dei quali fanno parte; essa comprende la diversità all'interno di ogni specie, tra le specie e degli ecosistemi". È in questo periodo che si sviluppa quindi la consapevolezza che la salute umana, il benessere, la sicurezza e la cultura sono influenzate dalla biodiversità, le cui variazioni incidono sulla fornitura dei servizi ecosistemici, definiti come "i benefici multipli forniti dagli ecosistemi al genere umano" (Millennium Ecosystem Assessment, 2001).

La biodiversità, come base per tutti i servizi ecosistemici, svolge un ruolo fondamentale nel mantenere e migliorare il benessere del pianeta. Essa comprende gran parte del capitale naturale rinnovabile su cui si fondano i mezzi di sussistenza e di sviluppo. Tuttavia, le profonde modifiche all'ambiente naturale, avvenute nell'ultimo secolo, con il crescente consumo globale di risorse, l'urbanizzazione e la riduzione delle superfici naturali, la frammentazione degli ecosistemi, hanno avuto profonde ripercussioni negative sulla biodiversità; ciò apre nuove sfide tese a bilanciare i valori culturali, economici, sociali e ambientali in modo che la biodiversità venga conservata e utilizzata in un modo tale che sia disponibile anche per le generazioni future, in un'ottica di sviluppo sostenibile.

Riuscire ad arrestare la perdita di biodiversità è un'operazione molto complessa in quanto vanno preservati i diversi livelli di organizzazione biologica (geni, individui, popolazioni, specie ed habitat) e tutte le interazioni intercorrenti tra essi e l'ambiente esterno, incluse le attività umane rilevanti per la conservazione e l'uso sostenibile della diversità biologica (diversità culturale). Per questo motivo, un'efficace strategia per la conservazione della natura deve prevedere l'integrazione di diverse conoscenze e tecniche di conservazione, attraverso un approccio multidisciplinare che va sotto il nome di "conservazione integrata" (Piotto et al., 2010).

Essa combina la conservazione *in situ* dell'ambiente naturale, soprattutto all'interno delle Aree Protette, con la conservazione del germoplasma *ex situ* sommata a tecniche di coltivazione e propagazione.

Alla conservazione *in situ*, che prevede la protezione degli habitat, il mantenimento delle popolazioni locali e l'istituzione di aree protette, devono quindi essere affiancate tecniche di recupero ambientale e di gestione del territorio, attuate attraverso reintroduzioni, conservazione di germoplasma *ex situ*, ecc. L'approccio di "conservazione integrata" è importante non solo nel caso di specie gravemente minacciate che corrono il rischio di estinguersi in breve tempo, ma anche per la tutela dell'agro-biodiversità e delle specie di interesse forestale.

Lo scopo del presente studio è valutare la qualità di tre diversi lotti di sementi attraverso l'utilizzo di test standard ISTA (International Seed Testing Association). Il punto focale del lavoro è il coinvolgimento di sei laboratori sementi italiani che effettuano test di germinazione su campioni diversi ma provenienti dagli stessi lotti di seme, con lo scopo di stabilirne la qualità. I semi utilizzati per questo test appartengono a *Populus nigra*, specie che presenta varie problematiche di conservazione poiché produce semi che tendono a perdere la vitalità abbastanza rapidamente. Questo aspetto porta a due considerazioni di base: in primo luogo rende difficoltosa una eventuale conservazione dei semi in un'ottica di utilizzi futuri, e in secondo luogo rende quasi impossibile la propagazione di tale specie attraverso il seme.

1.1 STRATEGIE DI CONSERVAZIONE

Vi sono due strategie di conservazione, ciascuna composta da varie tecniche che si possono adottare per conservare una determinata specie. Le due strategie sono denominate *ex situ* e *in situ*. L'articolo 2 della Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD, 1992) fornisce la seguente definizione di queste categorie. La conservazione *ex situ* è: “La conservazione di elementi costitutivi della diversità biologica al di fuori dei loro ambiente naturale”. Mentre la conservazione *in situ* è: “La conservazione degli ecosistemi e degli habitat naturali ed il mantenimento e la ricostruzione delle popolazioni vitali di specie nel loro ambiente naturale e, nel caso di specie addomesticata o coltivate, nell’ambiente in cui hanno sviluppato le loro caratteristiche.”

C'è una evidente differenza tra queste due strategie: la conservazione *ex situ* comporta il campionamento, il trasferimento e la conservazione del materiale genetico di una specie. Al contrario, la conservazione *in situ* comporta la designazione, la gestione e il monitoraggio della specie target all'interno del suo habitat.

1.1.1 Conservazione Ex Situ

Le strategie di conservazione *ex situ* di specie vegetali sono molteplici in funzione delle caratteristiche della specie da conservare. Nella conservazione *ex situ*, i campioni di materiale genetico appartenenti ad una specie, sottospecie o varietà sono prelevati in campo e conservati sotto forma di collezioni nelle banche genetiche, nei giardini botanici o negli arboreti, o sotto forma di campioni di seme, sperma, ovuli, tuberi, tessuti meristemati, polline, o DNA in condizioni artificiali speciali.

Di tutte le forme di conservazione *ex situ*, particolarmente rare risultano le collezioni *in vitro* (cioè il mantenimento di tessuti in un ambiente sterile), quelle di polline e spore, e ancor più rare le banche di DNA. Le più diffuse sono le collezioni di piante in campo (vivai, riserve genetiche, orti botanici) e le collezioni di semi.

1.1.2 Banche del germoplasma

La raccolta e lo stoccaggio di semi è il metodo più conveniente ed usato per la conservazione di specie vegetali. Questa tecnica prevede la raccolta di campioni provenienti da un certo numero di individui o popolazioni e in seguito il trasferimento in una banca del germoplasma per la conservazione.

Lo stoccaggio di materiale genetico all'interno di banche del germoplasma comporta una serie di attività complesse e interdipendenti (Rao et al., 2006). Il primo passo per la conservazione *ex situ* della diversità vegetale consiste nel reperimento del germoplasma che può avvenire attraverso la raccolta nelle aree di biodiversità genetica note, attraverso l'attività di ricerca, o attraverso le donazioni da altre banche. Dopo il ricevimento, i campioni vengono registrati ed inseriti nella raccolta, a condizione che soddisfino gli standard qualitativi richiesti e che le informazioni di accompagnamento siano complete. La procedura per l'accettazione di un campione in una banca del germoplasma comporta operazioni preliminari come la pulizia, l'asciugatura e l'esecuzione di test qualitativi come la determinazione dell'umidità e test di germinazione. I campioni conservati devono possedere un'alta percentuale di semi vitali; per prevenire problemi relativi alla perdita di vitalità è necessario che si verifichino più condizioni: uno stoccaggio in condizioni appropriate, il controllo periodico dei semi per valutarne la vitalità e la rigenerazione quando la situazione lo richiede (Rao et al., 2006).

La procedura utilizzata per la maggior parte delle specie vegetali consiste nel portare i semi maturi ad un basso contenuto di umidità (5-6%) e a basse temperature, preferibilmente -18°C o più basse (FAO/IPGRI, 1994). Tale metodo è adatto solo per le specie di seme che possono essere essiccate e conservate a bassa temperatura senza il rischio di perdere la vitalità. I vantaggi di questa tecnica sono l'efficienza e la riproducibilità, oltre alla discreta facilità nella realizzazione per la conservazione a breve, medio e lungo termine. Gli svantaggi sono rappresentati dalle problematiche che si possono incontrare per la conservazione delle specie vegetali che producono semi classificati come recalcitranti, semi, cioè che non tollerano le basse temperature e la perdita di umidità e che quindi non possono essere essiccati e congelati.

1.2 IL SEME, STRUTTURA E CARATTERISTICHE

Il seme è una struttura caratteristica delle spermatofite o piante a seme, comprendenti le gimnosperme e le angiosperme (Pasqua et al., 2011). Nelle prime è portato sulla superficie di una squama, nelle seconde è racchiuso nel frutto. Il seme può essere definito come un ovulo maturo che contiene un embrione e del materiale di riserva (endosperma), avvolto da uno o due tegumenti. Nelle angiosperme, a seguito della doppia fecondazione, si forma lo zigote diploide e l'endosperma triploide. Attraverso successive suddivisioni cellulari lo zigote formerà l'embrione. L'embrione è formato da un asse principale sul quale si inseriscono i cotiledoni (fig.1). Al di sopra dell'inserzione dei cotiledoni si trova l'epicotile, con il meristema apicale caulinare (o del germoglio). Al di sotto dei cotiledoni si trova l'ipocotile alla cui estremità è presente il meristema apicale radicale. A seme maturo uno o entrambi i tegumenti dell'ovulo si induriscono e diventano i tegumenti del seme, che lo avvolgono e lo proteggono.

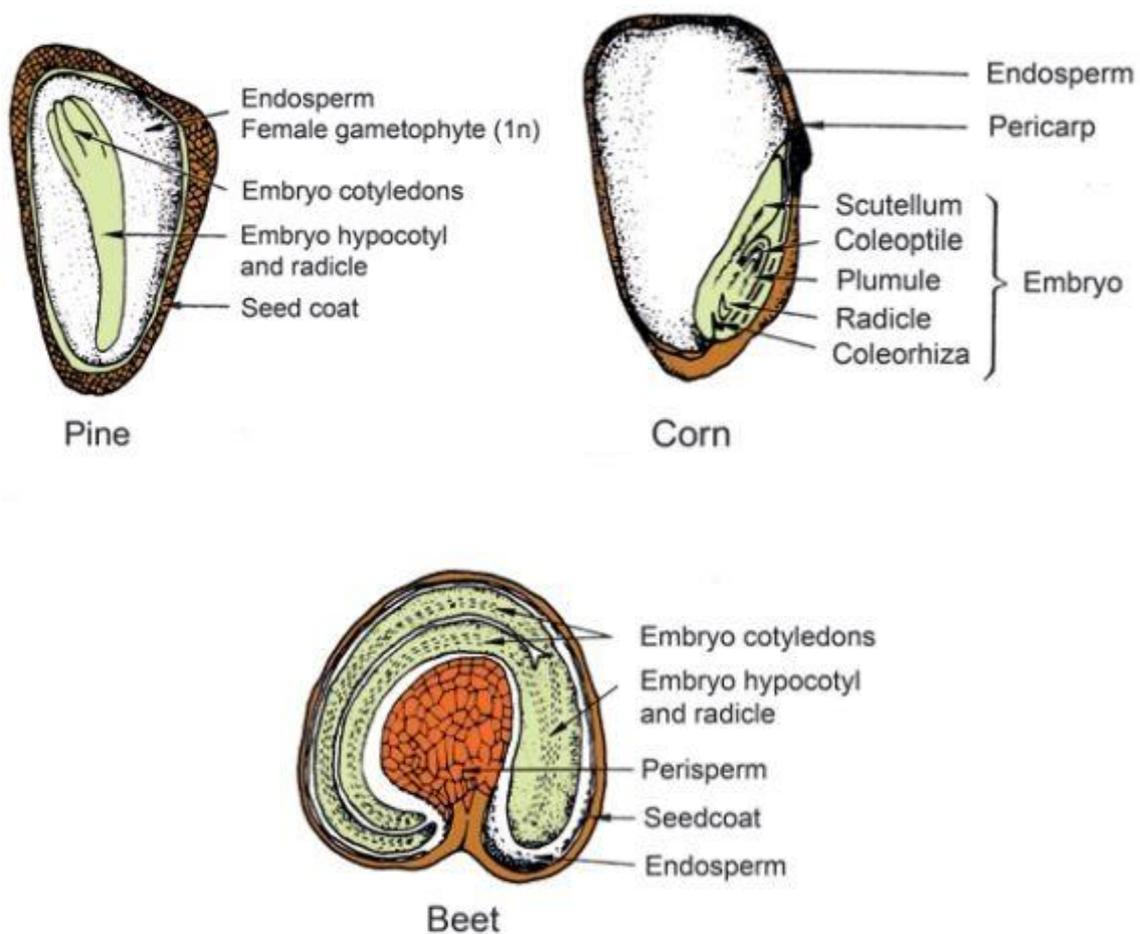


Figura 1, Struttura interna di semi policotiledoni, monocotiledoni e dicotiledoni (Hartmann & Kester, 2010).

Il seme svolge due funzioni: fungere da organo di sopravvivenza durante le stagioni sfavorevoli e propagare la specie nello spazio, facendo nascere nuovi individui su un territorio più vasto possibile (Pasqua et al., 2011). Al fine di ottimizzare la dispersione del nuovo sporofito e allontanarsi dalla pianta madre, nel corso dell'evoluzione, le piante hanno messo in atto strategie di varia natura (Pasqua et al., 2011). Semi estremamente leggeri, vengono trasportati direttamente dal vento a lunghe distanze (anemocoria). In molte specie i tegumenti del seme si modificano sviluppando appendici pelose o alate in modo da rimanere sospesi in aria per lungo tempo. Nell'ambito delle gimnosperme, ad esempio, sono alati i semi di diverse specie di pino. Tra le angiosperme i semi di pioppo o di salice hanno i tegumenti ricoperti di peli soffici e piumosi (pappo). Sfruttare gli animali per trasportare i propri semi (zoocoria) è una strategia che hanno adottato alcune specie. In alcuni casi, i frutti presentano strutture ad uncino o spine in grado di impigliarsi nel pelo di vari animali; quando gli animali se ne liberano i semi cadono a terra e possono germinare. In specie con frutti commestibili, quando questi vengono mangiati, i semi sono in grado di attraversare l'apparato digerente senza danni, per poi essere rilasciati con gli escrementi. Possono inoltre fungere da mezzi di dispersione dei semi sia le acque piovane, sia i corsi d'acqua (idrocoria). Esistono infine piante la cui disseminazione non dipende dall'ambiente (autocoria): nella specie *Ecballium elaterium* il frutto contiene un gas sotto pressione e una sostanza mucillaginosa. Spontaneamente o al minimo contatto, i semi vengono spruzzati a distanza a causa della pressione idrostatica che si forma al loro interno nel momento della maturazione.

1.2.1 La germinazione

Da un punto di vista biologico, i semi sono ovuli maturi. Al momento della separazione dalla pianta madre, il seme è formato da un embrione e da sostanze di riserva (solitamente endosperma e cotiledoni), entrambi racchiusi in un involucro protettivo (tegumento o pericarpo). La germinazione consiste nell'attivazione dei meccanismi metabolici del seme che porta alla nascita di un nuovo germinello. Per la germinazione di un seme maturo, devono essere soddisfatte tre condizioni (Jann & Amen, 1977):

1. Il seme deve essere vitale; ovvero l'embrione deve essere vivo.
2. Il seme deve essere sottoposto a condizioni ambientali appropriate: acqua, un intervallo adeguato di temperatura, ossigeno e luce.
3. Qualsiasi condizione di dormienza primaria eventualmente presente nel seme deve essere superata (Baskin & Baskin, 1998).

Il processo di germinazione inizia con l'assorbimento di acqua da parte del seme secco e termina con l'allungamento dell'asse embrionale (Bewley & Black, 1994).

Il seme non viene inumidito uniformemente durante l'imbibizione. In un primo momento, mentre le porzioni più esterne del seme saranno idratate, quelle più interne si troveranno ancora asciutte. Inoltre le molecole che compongono il seme possono inumidirsi in maniera differenziata a seconda delle loro caratteristiche chimiche. L'amido è più idrofobico delle proteine e l'endosperma amidaceo sarà quindi idratato più lentamente rispetto all'embrione ricco di proteine (Hartmann & Kester, 2010).

Il segno visibile che la germinazione è completa è la penetrazione della radichetta nelle strutture circostanti l'embrione.

L'imbibizione di acqua da parte del seme segue un aumento trifasico a causa del crescente assorbimento di acqua (Fig.2.); le tre fasi comprendono un rapido assorbimento iniziale di acqua (fase 1) seguita da una fase di plateau, in cui il seme accelera le sue attività metaboliche ma vi è un inferiore assorbimento di acqua rispetto alla prima fase (fase 2). La germinazione termina con l'elongazione della radichetta (fase 3).

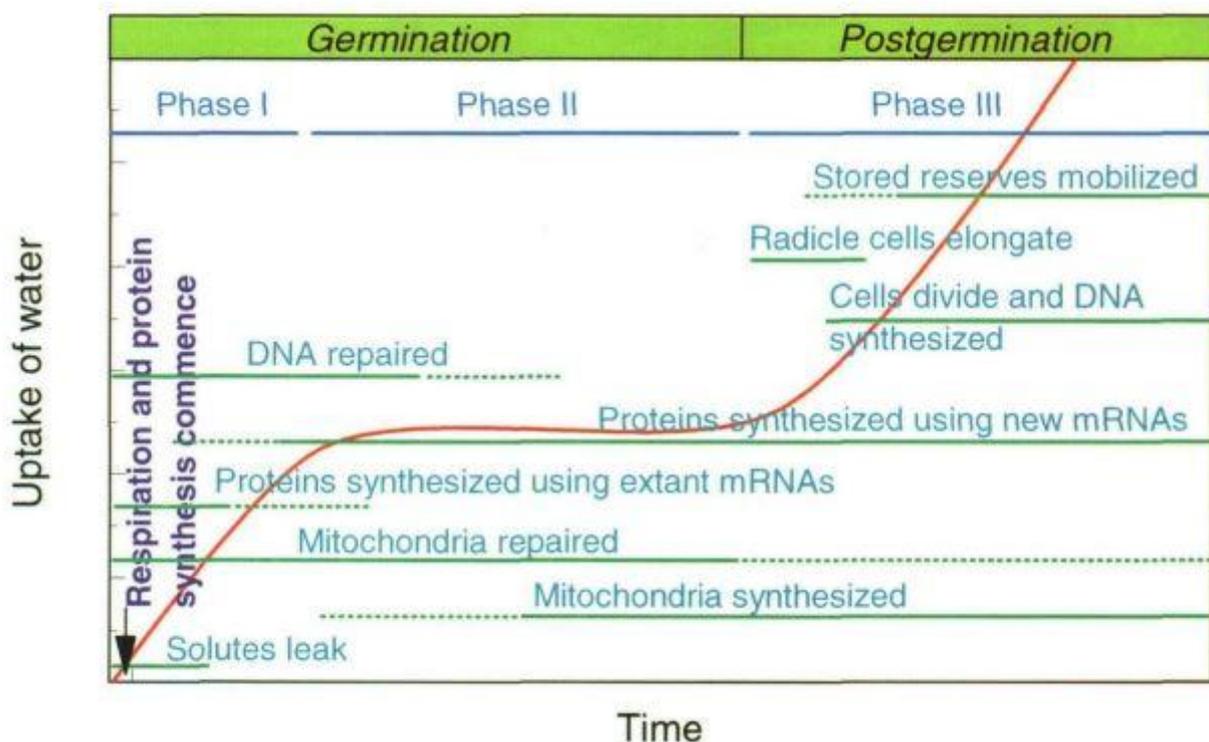


Figura 2, Le tre fasi della germinazione possono essere descritte in base l'aumento nell'assorbimento di acqua. (imbibizione, fase di plateau, protrusione della radichetta) (Bewley,1997).

L'intero processo di germinazione si basa sul potenziale idrico delle cellule del seme e dell'embrione (Hartmann & Kester, 2010). Quando ci si riferisce alla germinazione, il potenziale idrico è una misura della capacità di una cellula ad assorbire acqua dall'ambiente circostante. Le variazioni del potenziale idrico sono la forza trainante della germinazione. La maggior parte dei semi si presentano in condizioni di umidità interna molto bassa (meno del 10%) dopo aver completato lo sviluppo. Ciò si traduce in un potenziale idrico molto basso, in prossimità di -100/ -350 MPa (Shaykewich, 1973).

Questo parametro è descritto come la somma fra tre diversi componenti:

Potenziale idrico (ψ_{cell}) = potenziale di matrice (ψ_m) + potenziale osmotico (ψ_π) + potenziale di pressione (ψ_p)

Il potenziale di matrice è la forza principale responsabile per l'assorbimento dell'acqua durante l'imbibizione. Tale forza è dovuta all'idratazione dei componenti secchi del seme e delle macromolecole come amido e proteine.

Il potenziale osmotico e il potenziale di pressione determinano l'assorbimento di acqua durante la fase in cui si verifica la protrusione della radichetta. Il potenziale osmotico è una misura dei soluti osmoticamente attivi in una cellula, incluse molecole come acidi organici, amminoacidi, zuccheri e ioni inorganici. Esso viene espresso come un valore negativo. Il potenziale di pressione è invece causato dall'acqua all'interno della cellula che preme contro la parete cellulare, in genere tale valore è positivo e viene definito come pressione di turgore. Questo parametro è anche l'espressione della capacità della parete cellulare di espandersi.

I semi possono essere danneggiati fisicamente durante l'imbibizione. I rivestimenti dei semi sono di solito molto igroscopici, rallentando così l'afflusso di acqua che potrebbe danneggiare i tessuti interni. Pertanto, semi con danni fisici al tegumento, possono essere danneggiati dal forte afflusso di acqua durante l'imbibizione. Alzare il contenuto di umidità dei semi (anche fino al 20%) prima della germinazione può ridurre le lesioni dovute all'imbibizione in lotti di sementi sensibili (Herner, 1986).

Fase di plateau

Sebbene la fase di latenza sia definita come un periodo di riduzione o assenza di assorbimento d'acqua, si tratta di una fase molto attiva fisiologicamente (Bewley & Black, 1994). Durante questa fase, il seme secco quiescente riprende rapidamente la sua attività metabolica. Le strutture e gli enzimi necessari per la ripresa iniziale dell'attività metabolica sono generalmente presenti all'interno del seme secco, sopravvissuti almeno

parzialmente, alla fase di essiccazione che termina con la maturazione del seme. La reintroduzione di acqua durante l'imbibizione è sufficiente per la ripresa delle attività metaboliche e la sostituzione o la ricostruzione delle molecole fondamentali.

In questa fase sono dunque presenti le attività metaboliche principali che preparano il seme alla germinazione. Le attività cellulari critiche per una germinazione normale sono:

1. "Maturazione" dei mitocondri. I mitocondri sono presenti nei tessuti del seme secco maturo e devono essere quindi reidratati poiché le membrane interne devono diventare enzimaticamente attive. Nonostante questi organelli si presentino scarsamente differenziati, come conseguenza della essiccazione, contengono sufficienti enzimi del ciclo di Krebs e ossidasi terminali per fornire adeguata quantità di ATP per sostenere il metabolismo per diverse ore a seguito dell'imbibizione (Ehrenshaft & Brambl, 1990; Attucci et al., 1991). Durante la germinazione sembrano esserci due distinti modelli di sviluppo mitocondriale. Questi modelli dipendono dalla natura chimica delle riserve immagazzinate. Nei semi ricchi di amido, prevale la riparazione e l'attivazione di organelli preesistenti, mentre i semi ricchi di oli in genere producono nuovi mitocondri (Morohashi & Bewley, 1980; Morohashi, 1986).

In poche ore di imbibizione, i mitocondri appaiono dunque normali se osservati al microscopio elettronico, e si registra un aumento sostanziale sia nella respirazione che nella sintesi di ATP.

2. Sintesi proteica. Nonostante l'mRNA sia presente nel seme secco, la sintesi proteica non avviene fino alla formazione dei polisomi dopo l'idratazione seme. Le nuove proteine si formano infatti entro qualche ora dal completamento dell'imbibizione. La sintesi di nuove proteine durante la fase di latenza è fondamentale per la germinazione.

3. Metabolismo delle molecole di riserva. Consiste nella rottura enzimatica delle macromolecole di riserva, allo scopo di produrre substrati per la produzione di energia, e amminoacidi per sintetizzare nuove proteine. Tali reazioni producono anche soluti osmoticamente attivi (come il saccarosio) che possono portare ad un cambiamento del potenziale idrico delle cellule all'interno dell'embrione in ottica della protrusione della radichetta.

Protrusione radichetta

La prima prova visibile della germinazione è la protrusione della radichetta. Tale risultato è causato inizialmente dall'allargamento delle cellule piuttosto che dalla divisione cellulare

(Barroco et al., 2005). Tuttavia, subito dopo l'inizio dell'allungamento della radichetta possono essere rilevati fenomeni di divisione cellulare localizzabili all'apice della radichetta (Masubelele et al., 2005). La protrusione della radichetta è controllata da due forze opposte (Fig.3): il potenziale di crescita dell'embrione e la resistenza fisica che presentano i rivestimenti del seme.

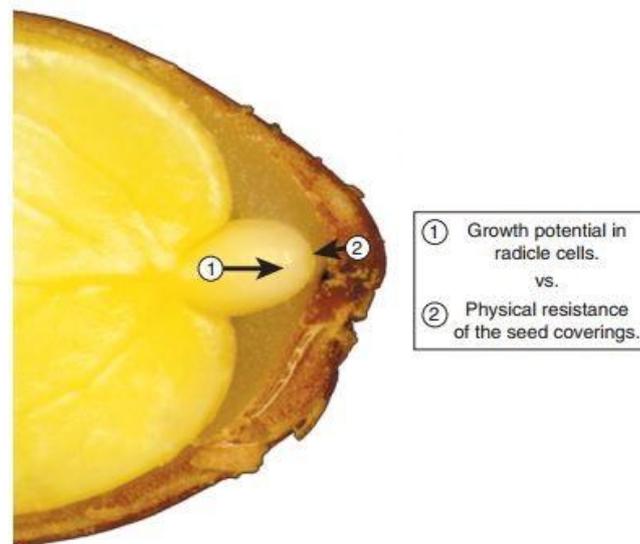


Figura 3, L'equilibrio di forze coinvolte nella germinazione. In molti semi il tegumento fornisce una resistenza fisica per l'elongazione della radichetta. La capacità della radichetta di penetrare i rivestimenti del seme determina la velocità di germinazione (Hartmann & Kester, 2010).

La protrusione si verifica quando:

- Il potenziale idrico delle cellule nella radichetta diventa negativo a causa del metabolismo delle molecole di riserva. Il potenziale osmotico delle cellule diventa negativo a causa dell'accumulo di soluti, forse come risultato dell'idrolisi delle riserve polimeriche presenti all'interno delle cellule stesse. La diminuzione nel potenziale osmotico porta ad un maggiore assorbimento di acqua e il conseguente aumento del turgore guiderebbe l'estensione delle cellule.
- Le pareti cellulari della ipocotile e della radichetta diventano più flessibili per consentire l'espansione delle cellule; o quando le cellule nei tessuti circostanti al seme si indeboliscono per consentire l'espansione delle cellule nella radichetta (Ni & Bradford, 1993). La combinazione di uno o più di questi fattori sono alla base del controllo della germinazione, con variazioni a seconda delle specie e dei tessuti che ricoprono la radichetta.

La crescita del germinello inizia con l'allungamento del sistema radicale e di quello aereo nell'asse embrionale, seguita da un'espansione delle strutture del semenzale. Una volta che la crescita ha inizio, il peso fresco dei nuovi tessuti del germinello aumenta, viceversa il peso dei tessuti di riserva tende a diminuire. Il tasso di respirazione, misurato dal consumo di ossigeno, aumenta costantemente con la crescita. In questa fase i tessuti di riserva del seme cessano di essere coinvolti nelle attività metaboliche, tranne in quelle specie vegetali in cui i cotiledoni diventano parte attiva nella fotosintesi (Hartmann & Kester, 2010).

L'assorbimento di acqua aumenta costantemente con l'aumentare della massa radicale. La crescita di un germinello segue uno dei due modelli di germinazione (Hartmann & Kester, 2010). Nella germinazione definita "epigea", l'ipocotile si allunga, formando una struttura a forma di gancio che solleva i cotiledoni dal suolo. La germinazione "ipogea" è caratterizzata da una mancata espansione dell'ipocotile, infatti soltanto l'epicotile emerge dal suolo, mentre i cotiledoni rimangono entro i rivestimenti seme.

1.2.2 Differenti comportamenti dei semi in base al contenuto di umidità

Roberts (1973) introdusse negli anni '70 del secolo scorso una classificazione dei semi che teneva conto delle differenti risposte fisiologiche durante la conservazione. Per identificare le due categorie Roberts ha introdotto i termini "ortodossi" e "recalcitranti". I semi ortodossi possono essere essiccati fino a bassi contenuti di umidità (inferiori al 12%) (Pasquini et al., 2010) senza subire danni e la loro longevità aumenta al diminuire dell'umidità e della temperatura di stoccaggio in modo quantificabile e prevedibile. Al contrario, i semi recalcitranti non possono sopravvivere alle temperature di congelamento e ad una essiccazione al di sotto di una soglia relativamente alta di umidità (tra il 12 e il 31%) (Roberts, 1973). L'umidità è quindi un fattore critico che determina la vitalità e la longevità sia dei semi recalcitranti che ortodossi. Per questo motivo, prima di identificare un metodo di conservazione si deve identificare la categoria di appartenenza del seme.

Semi ortodossi

I semi ortodossi, chiamati anche "tolleranti alla deidratazione" comprendono quei semi la cui conservazione è funzione del contenuto di umidità e della temperatura. Tale tipologia di semi può essere portata senza danni a bassi valori di umidità (inferiori al 12%) (Pasquini et al., 2010). Al di sopra di questo valore c'è una relazione logaritmica negativa tra contenuto di umidità delle sementi e la longevità (Ellis & Roberts, 1980). Per la temperatura, esiste una relazione negativa tra l'aumentare di questo parametro (almeno

all'interno dell'intervallo fra -20 e 90 °C) e la longevità delle sementi mantenendo il valore dell'umidità costante (Roberts, 1973). In sostanza, la longevità dei semi ortodossi aumenta con il diminuire della temperatura e del contenuto in umidità. Tale relazione è espressa nell'equazione di vitalità dei semi (Roberts, 1973; Ellis & Roberts, 1980). A questo gruppo appartengono la maggior parte delle specie vegetali alle nostre latitudini (Hong et al., 1998).

Semi recalcitranti

I semi recalcitranti non possono essere essiccati senza causare danni al seme stesso (Roberts, 1973). Quando i semi appartenenti a questa categoria vengono raccolti, la vitalità in un primo momento si riduce leggermente a causa della perdita di umidità dovuta all'essiccazione naturale. Nel momento in cui però l'umidità cala notevolmente (ad esempio a seguito di un trattamento di essiccazione artificiale) si arriva al raggiungimento di un contenuto di umidità soglia, definito come "contenuto di umidità critica" (King e Roberts, 1979). Se il processo continua, la vitalità tenderà allo zero. Il contenuto di umidità critico varia notevolmente tra le specie, i lotti di sementi e in base alla fase di maturazione del seme al momento della raccolta (Ellis et al., 1990). Esso può variare tra estremi del 23% del cacao (*Theobroma cacao*) (Mumford & Brett, 1982) e il 61,5 % per *Avicennia marina* (Farrant et al., 1986).

Non esiste un metodo soddisfacente per mantenere la vitalità dei semi recalcitranti nel medio/lungo termine dal momento che non possono essere né essiccati né conservati a temperature sotto lo zero, poiché sarebbero danneggiati dalla formazione di cristalli di ghiaccio a seguito del congelamento. La longevità dei semi recalcitranti è breve, da poche settimane ad alcuni mesi per le specie adattate agli ambienti tropicali (Roberts, 1979), e fino a 3 anni per diverse specie adattate agli ambienti temperati (Suszka & Tylkowski, 1981). Tuttavia, se l'ambiente di conservazione e di stoccaggio sono ottimali e determinati accuratamente, la longevità di alcuni semi recalcitranti tropicali può essere estesa a 3 anni (Corbineau & Côme, 1989).

La vitalità dei semi recalcitranti può essere mantenuta a percentuali di umidità elevate e con alte concentrazioni di ossigeno; queste circostanze minimizzano il deterioramento poiché possono funzionare i meccanismi di riparazione del seme (Villiers, 1975). Queste condizioni non sono però facilmente mantenibili, poiché con valori di umidità e concentrazione di ossigeno elevati i semi tendono a germinare. Per la conservazione a lungo termine è chiaramente essenziale che le condizioni ambientali impediscano o almeno ritardino la germinazione.

In generale, la vitalità si mantiene stabile (solo per periodi limitati) a contenuti di umidità inferiori dal 2 al 5% rispetto ai semi freschi (appena raccolti), e alle temperature di stoccaggio che variano da 7 °C a 17 °C per le specie adattate a climi tropicali, e tra circa -3 °C e 5 °C per le specie dei climi temperati (Hong et al., 1996). È comunque molto difficile conservare dei semi a queste condizioni (aerazione continua e livelli di umidità a livelli quasi post-raccolta) e allo stesso tempo impedire la germinazione o l'attacco di funghi e muffe. Appartengono a questa categoria i semi di piante tropicali come cacao, cocco e mango ma anche specie adattate a climi più freddi come *Quercus*, *Aesculus*, *Castanea*.

Semi intermedi

Oltre alle due categorie definite da Roberts (1973), è stata identificata una terza categoria, definita come "intermedia" (Ellis et al., 1990). Le specie di sementi appartenenti a questo gruppo, durante lo stoccaggio, mostrano un comportamento intermedio tra le categorie precedentemente descritte (Ellis et al., 1990). In particolare, i semi intermedi tollerano meglio la deidratazione rispetto ai recalcitranti, ma peggio rispetto agli ortodossi.

Tollerano l'essiccamento a valori di circa il 10-12% di umidità, ma anche fino al 20% a seconda della specie (valori in equilibrio con il 40-50% di umidità relativa a 20 °C), ma la vitalità si riduce se sottoposti ad ulteriore essiccazione.

Semi intermedi di specie di origine tropicale perdono la vitalità più rapidamente quando si abbassa la temperatura di conservazione a circa 10 °C. In alcuni casi, le temperature appena sotto gli 0 °C causano nei semi intermedi la perdita immediata di vitalità (Ellis et al., 1990).

1.3 POPULUS NIGRA

Il pioppo nero europeo (*Populus nigra* L.) (tab.1) è una specie eurasiatica (fig.4), che forma foreste lungo le rive dei fiumi negli ecosistemi ripariali.

Famiglia	Salicaceae
Genere	Populus
Specie	P. nigra

Tab. 1 Classificazione scientifica di P. nigra.

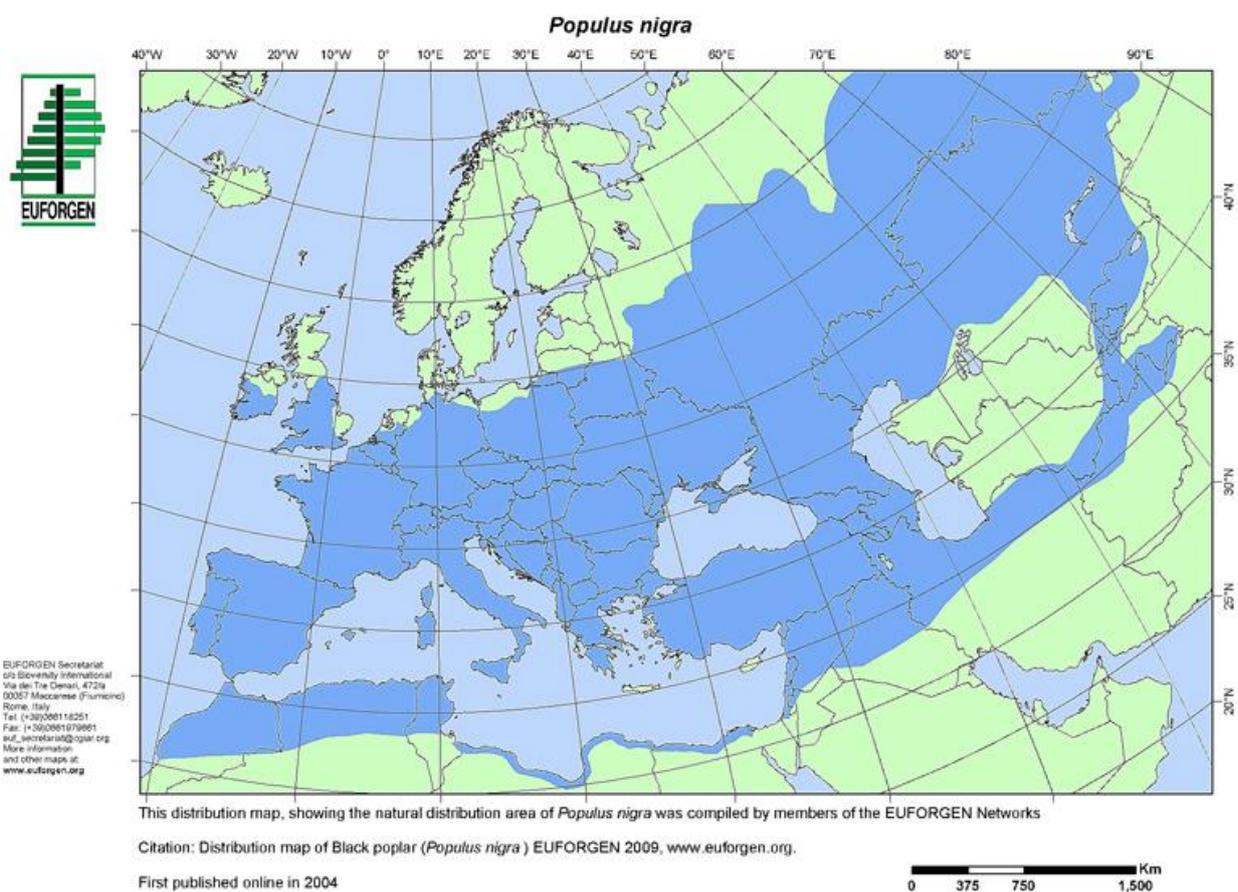


Figura 4, Distribuzione attuale di *Populus nigra* nel continente europeo (EUFORGEN, 2009).

Questa specie pioniera svolge un ruolo centrale nella fase iniziale dello sviluppo delle foreste che popolano le fasce riparie, contribuendo al controllo naturale delle inondazioni e della qualità dell'acqua. Le formazioni a pioppo svolgono inoltre la funzione di corridoio naturale che facilita il flusso genico per molte altre specie, implementando dunque la vitalità e la stabilità degli ecosistemi lungo il flusso del fiume. Grazie alla sua plasticità, *P.*

nigra è usato anche come specie per la protezione del suolo e rimboschimento in zone industriali inquinate (Popivshchy et al., 1997). Le aree ripariali sono caratterizzate da allagamenti stagionali; *Populus nigra* si è evoluto, attraverso molteplici adattamenti, per approfittare delle variazioni del regime idrogeomorfologico all'interno dei corridoi fluviali (Braatne et al., 1996). Il suo ciclo di vita, dalla impollinazione, alla formazione dei semi, dispersione e germinazione o moltiplicazione vegetativa, è ben sincronizzato con il regime fluviale, in particolare con la frequenza dei periodi di siccità e delle inondazioni periodiche. La fisiologia e la morfologia del pioppo sono adeguati per resistere alle forze idrauliche e ad immersioni prolungate. Le dimensioni, la forma e le proprietà biomeccaniche della radice e delle strutture aeree sono adattate per far fronte a disturbi idraulici che sono soliti verificarsi negli ecosistemi fluviali (Karrenberg et al., 2003; Lytle & Poff, 2004). Si tratta di una specie opportunistica e a rapida crescita, con una buona tolleranza a livelli elevati di sommersione e alle alte temperature estive.

P. nigra ha un areale di distribuzione molto ampio, dal confine del Mediterraneo a sud fino a 64° di latitudine a nord, e dalle isole britanniche all'Asia occidentale (Zsuffa, 1974). È una specie pioniera dell'ecosistema ripariale, rigorosamente eliofila, che costituisce metapopolazioni colonizzando aree aperte attraverso semi e propaguli (talee, polloni radicali) (Zsuffa, 1974; Herpka, 1986). Colonizza aree da 0 a 1000 metri di altitudine. Singoli esemplari possono vivere più di 400 anni (Popivshchy et al., 1997).

È una pianta dioica che in condizioni favorevoli raggiunge la maturità riproduttiva entro 10-15 anni (Stanton & Villar, 1996). Il polline viene disperso dal vento e il periodo di impollinazione può andare da uno a due mesi (Braatne et al., 1996). La fecondazione avviene entro 24 ore, dopo che un grano di polline vitale cade su uno stigma recettivo (Braatne et al., 1996). Quando i semi vengono rilasciati, si trovano immersi all'interno di una struttura cotonosa chiamata pappo. Il pappo favorisce la dispersione a grande distanza per mezzo del vento, garantendo alti tassi di migrazione. I pioppi sono prolifici produttori di sementi. In genere ne vengono prodotte in grandi quantità in primavera, contemporaneamente ad eventi di natura alluvionale che garantiscono disponibilità, ai bordi dei canali, di sedimenti umidi e ben drenati (Rood & Heinz-Milne, 1989; Niiyama, 1990). Vecchi esemplari di pioppo sono in grado di produrre oltre 50 milioni di semi in una sola stagione.

1.3.1 Raccolta, estrazione, e pulizia di semi

I semi possono essere raccolti in modo sicuro quando una piccola percentuale di capsule cominciano ad aprirsi (Brown, 1989; Fung & Hamel, 1993). Per il pioppo, è consigliabile che gli amenti siano raccolti dagli alberi quando i semi sono di colore paglierino chiaro; quelli raccolti prima di raggiungere questo stadio non maturano completamente, riducendo la percentuale di semi vitali (Brown, 1989). Rami con amenti immaturi possono essere raccolti, posti in acqua e fatti maturare in serra. È necessario prestare attenzione nel maneggiare gli amenti dopo che sono stati rimossi dall'albero. Il protocollo standard prevede il trasporto in un contenitore come un sacchetto di carta, che consente una certa circolazione dell'aria e da cui l'acqua può evaporare; ciò è particolarmente importante se gli amenti devono essere mantenuti nel contenitore per diversi giorni durante il trasporto. Una volta raccolti, i semi devono essere puliti. La pulizia comprende un insieme di processi che hanno come scopo la rimozione del cotone del pappo dai semi (fig.5).



Figura 5, Pappo dei semi di *Populus nigra* escluso dal processo di lavorazione.

A tale scopo possono essere utilizzati aria compressa proveniente da qualsiasi fonte e setacci con maglie di varie dimensioni. L'ampiezza delle maglie, espressa in micron o mesh, dipende dalle dimensioni dei semi. Le misure dei setacci genericamente raccomandati per il pioppo sono composti da una combinazione di 20, 28, 40, e 50 mesh disposti in maniera crescente dall'alto verso il basso (Harder, 1970). I semi sono generalmente raccolti nei setacci da 40 e 50 mesh.

Grandi quantità di semi possono essere puliti in modo efficiente con l'utilizzo di un tamburo rotante con o senza un ventilatore per soffiare i semi attraverso le maglie del setaccio;

mentre il cotone rimarrà nel tamburo i semi passeranno attraverso e verranno poi raccolti dai setacci. Piccole quantità di semi possono essere invece separati dal cotone del pappo strofinandoli a mano sempre su dei setacci (Maisenhelder, 1951). Tuttavia, alcune stime riportano che solo circa il 20% dei lotti può essere estratto utilizzando questo metodo (Maisenhelder, 1951). Simak (1980) sottolinea che i semi secchi o fragili possono essere danneggiati durante la manipolazione nel processo estrattivo. I detriti possono essere parzialmente rimosso da lotti di sementi pioppo applicando attentamente aria a bassa pressione. I lotti di semi puliti con questa tecnica sono virtualmente esenti da contaminazione. Se le necessità lo richiedono, la procedura di lavorazione può comprendere anche l'essiccazione dei semi di pioppo per portarli ad un contenuto di umidità accettabile.

1.3.2 Conservazione

In condizioni naturali, i semi di pioppo mantengono la vitalità per periodi brevi, variabili da 2 settimane a un mese, con possibili variazioni a seconda della specie, della stagione, e del microambiente. Semi di pioppo possono avere una vitalità più lunga in condizioni apparentemente avverse come in terreni freddi (Graham et al., 1963; McDonough, 1979; Zasada & Densmore, 1977).

Tra le specie arboree, i semi di pioppo sono uno dei migliori esempi di semi con una breve durata. Tuttavia, con una corretta essiccazione ed uno stoccaggio a temperature sotto zero in contenitori sigillati, la vitalità dei semi di *P. tremuloidese* e di *P. grandidentata* (Wang, 1982) è stata mantenuta a livelli abbastanza elevati (da 10 a 12 anni). La perdita di vitalità durante i periodi di stoccaggio relativamente lunghi varia da specie a specie e dai singoli organismi all'interno delle specie (Asakawa, 1980; Simak, 1980; Tauer, 1979; Wang, 1982; Zasada & Densmore, 1980). Ad esempio, Tauer (1995) riporta che la percentuale di germinazione variava dal 3 al 53% tra i singoli individui dopo 12 anni di conservazione, mentre la germinazione iniziale era compresa tra il 47 e il 100%.

Per il pioppo non esiste un metodo di conservazione che risulta essere generalmente accettabile per tutte le specie (Simak, 1980). Vi sono però elementi importanti da tenere in considerazione per mantenere la vitalità a lungo termine:

- Per mantenere la vitalità dei semi di pioppo a lungo termine sono importanti trattamenti di asciugatura/essiccazione durante l'apertura della capsula e subito dopo l'uscita del seme (Simak, 1980). Il contenuto di umidità desiderata per diverse specie sembra essere tra il 6 e il 10% (peso secco) (Simak, 1980; Tauer, 1979; Zasada & Densmore, 1977), anche se

Wang (1982) ha riportato una buona conservazione a lungo termine a valori di umidità dell'11 - 15%. La vitalità dei semi è mantenuta anche a percentuali di umidità inferiori, ma il vigore della piantina risulta più basso (Simak, 1980).

- Alcune ricerche hanno confrontato lo stoccaggio sotto vuoto e con vari disidratanti allo stoccaggio standard in contenitori sigillati. I risultati riportano situazioni molto diverse, con effetti positivi, negativi o neutri, e non possono essere ritenuti definitivi.

Aspetto controverso è la temperatura ottimale di conservazione, che risulta essere molto differente a seconda della fonte che si considera, tuttavia, temperature che vanno dai 5 ai 24 °C sono considerate accettabili per la conservazione e il mantenimento della vitalità (Benson & Harder, 1972; Fechner et al., 1981; Simak, 1980; Wang, 1982). I semi possono essere conservati anche a temperature che vanno da 0 a 5 gradi, ma la longevità è più breve e possono verificarsi alti livelli di germinazione anomala (Bonner & Karrfalt, 2008).

1.3.3 Germinazione

I semi di pioppo non presentano dormienza (incapacità di germinazione anche in condizioni favorevoli) e germinano a temperature che variano da 2 a 40 °C. Il tempo medio richiesto ai semi di pioppo per raggiungere le varie fasi di germinazione in serra è quantificabile in ore/giorni (Wyckoff & Harder, 1996). Temperature ottimali per la germinazione possono variare a seconda delle specie, ma entrano nell'intervallo fra 20 e 30 °C. Il tasso di germinazione aumenta con la temperatura, ma sembra essere abbastanza uniforme nell'intervallo fra 15 e 20 °C per poi diminuire leggermente a temperature superiori ai 30-35 °C. Temperature superiori ai 35 °C causano un forte calo nella germinazione (Farmer & Bonner, 1967; McDonough, 1979; Zasada & Densmore, 1980; Zasada & Viereck, 1975). I semi germinano pienamente nella più completa oscurità, ma il tasso di germinazione in queste condizioni può essere inferiore rispetto alla germinazione con la luce (Asakawa, 1980; McDonough, 1979).

La germinazione si verifica su una vasta gamma di substrati. Alcune specie di *Populus* sembrano avere requisiti abbastanza rigorosi mentre altre sono meno esigenti. Substrati con un rifornimento costante di acqua durante la germinazione e con un pH che può variare dal neutro al leggermente basico o leggermente acido, forniscono le condizioni per la massima germinazione (Dickmann & Stuart, 1983; Farmer & Bonner, 1967; Fechner et al., 1981; McDonough, 1979). Semi di *Populus* germinano anche mentre galleggiano in acqua o quando sono completamente sommersi (Hosner, 1957; Krasny et al., 1988).

Substrati con elevate concentrazioni saline sembrano ridurre il potenziale di germinazione (Krasny et al., 1988; McDonough, 1979; Shafroth et al., 1995).

Questi aspetti della germinazione si applicano ai semi freschi. I risultati possono variare per i seguenti motivi:

-Semi conservati per diverso tempo possono germinare lentamente e mostrare un tasso di germinazione maggiormente ridotto rispetto ai semi freschi; ciò può essere particolarmente vero quando la germinazione avviene al di fuori dell'intervallo ottimale di temperatura (Farmer & Bonner, 1967; McDonough, 1979).

-I semi di piccole dimensioni non mostrano lo stesso tasso di germinazione dei semi di grandi dimensioni. Ad esempio, Faust (1936) ha rilevato che i semi raccolti da un setaccio di 40 mesh hanno mostrato una percentuale di germinazione di meno della metà dei semi raccolti in un setaccio di 30 mesh. La stessa relazione è stata verificata per i semi nei setacci da 40 e 50 mesh (Rudolph, 1978).

2. MATERIALI E METODI

Il presente lavoro, che si pone come scopo la valutazione della qualità di tre differenti lotti di *Populus nigra*, si è articolato in più fasi, nelle quali sono stati effettuati vari test di tipo qualitativo come l'analisi di purezza specifica, peso di mille semi, determinazione del contenuto di umidità e test di germinazione. I test utilizzati fanno riferimento agli standard ISTA (International Seed Testing Association) (ISTA, 2014).

La prima fase prevede il campionamento di tre lotti di semi, ovvero il processo attraverso il quale da un lotto iniziale di grandi dimensioni si arriva alla formazione dei "submitted sample" rappresentativi dell'intero lotto. Dai submitted sample si effettuano i primi tre test, ovvero la determinazione del contenuto di umidità, l'analisi di purezza e il peso di mille semi. Queste analisi, vengono eseguite solamente dalla struttura che si occupa della preparazione dei campioni e non dai restanti cinque laboratori che ricevono i campioni. I risultati concorreranno comunque alla caratterizzazione qualitativa dei lotti. Le analisi sono eseguite su tre lotti differenti di pioppo e ogni laboratorio che partecipa analizza un campione di ciascuno dei tre lotti. Poiché i partecipanti sono sei dovranno essere preparati un totale di diciotto campioni. Preventivamente vengono allestite le buste adatte a contenere il campione che presenteranno una etichettatura idonea per identificare specie, lotto e numero del campione. Una volta pronti, i campioni sono consegnati ai vari laboratori. L'analisi in comune fra tutti i laboratori è il test di germinazione. Terminato il test si procede alle opportune elaborazioni dei dati per determinare la qualità dei lotti.

2.1 CAMPIONAMENTO

Quando un campione di semi viene sottoposto a test standard, si deve rispettare la regola di base secondo la quale il campione da analizzare deve essere rappresentativo, in ogni suo aspetto, del lotto originale. Un campione dovrebbe avere pertanto le medesime caratteristiche come la dimensione media dei semi, il contenuto di umidità, la purezza e la vitalità del lotto di partenza. Più alto è il grado di rappresentatività di un campione, più i risultati del test potranno essere ritenuti validi e vicini al valore "vero" della qualità del lotto di seme.

In base agli standard ISTA (ISTA, 2014), si distinguono varie tipologie di campioni (fig. 6). Un campione primario corrisponde a una porzione di sementi prelevata da un lotto, durante una singola azione di campionamento. Quando si eseguono prelievi da diverse parti di un lotto si costituisce un campione composto, che è dunque formato combinando e mescolando tutti i campioni primari. Solitamente, il campione composto è diverse volte più

grande rispetto al campione effettivamente necessario per il test: per i test ufficiali ISTA infatti ad ogni specie corrisponde una quantità precisa di seme da prelevare e sottoporre ai test. Un submitted sample è il campione che viene inviato al laboratorio di prova e può comprendere sia la totalità del campione composito, sia un sottocampione dello stesso. Il submitted sample può essere dunque suddiviso in ulteriori sottocampioni. Il submitted sample, o un suo sottocampione, corrisponde al campione di lavoro, sul quale si esegue l'analisi di purezza specifica. Sulla frazione di seme puro risultante, si eseguono in seguito gli altri test come il peso di mille semi, test di germinazione o test al tetrazolo a seconda della specie e delle richieste specifiche.

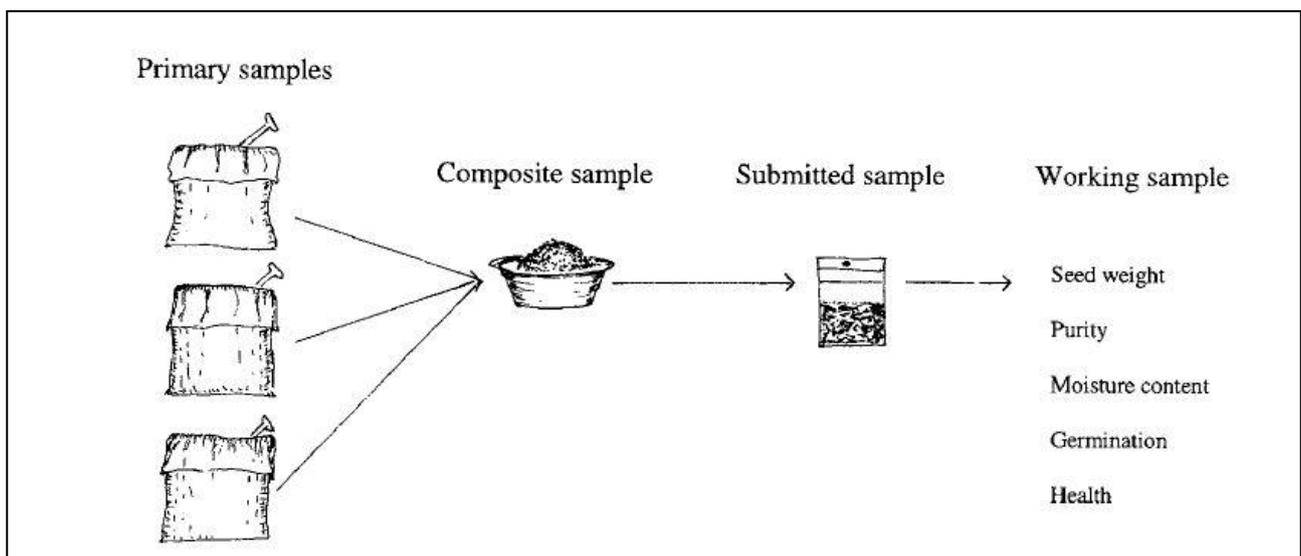


Figura 6, I diversi campioni nel processo di campionamento (Schmidt, 2000).

La riduzione della dimensione dei campioni, deve essere condotta osservando le stesse regole di mantenimento della rappresentatività e i metodi di riduzione utilizzati per definire il campione di lavoro sono uguali a quelli impiegati per il campionamento dei lotti di semi. Il campione totale viene versato su una superficie liscia e viene suddiviso manualmente in parti uguali che vengono successivamente inserite in appositi contenitori. La procedura può essere ripetuta più volte a seconda della quantità iniziale di seme. In alternativa, se le dimensioni e le caratteristiche dei semi lo consentono, i campioni possono essere ridotti e separati utilizzando divisori meccanici.

2.1.1 Campionamento *Populus nigra*

I lotti di seme sono stati raccolti fra le provincie di Trento e Verona, lungo il corso del fiume Adige. In particolare:

LOTTO#1-LAV 004/14 Bosco dell'Adige LRBS n°322 Veneto (Vr)

LOTTO#2-LAV 005/14 Bassa Vallagarina (Tn)

LOTTO#3-LAV 006/14 Biotopo Adige - Garda (Tn)

I lotti di sementi sono stati controllati al fine di eliminare eventuali impurità residue (residui di cotone, del pappo o impurità più grossolane) non facilmente eliminabili in fase di lavorazione. Successivamente, i semi sono stati mescolati per garantire l'omogeneità tra i campioni.

Per le operazioni di mescolamento e suddivisione è stato utilizzato un divisore meccanico (fig.7). I semi vengono posti nella estremità superiore dell'apparecchiatura; questi sfruttando la forza di gravità passano attraverso il meccanismo interno del divisore che smista l'intero campione in due parti che sono raccolte nei contenitori posti alle estremità inferiori.



Figura 7, Divisore meccanico Boerner.

Per ogni lotto di *Populus nigra* sono state eseguite due divisioni consecutive del lotto iniziale, tali da formare un submitted sample di circa 100 grammi per ciascuno dei tre lotti (fig.8). In dettaglio, il submitted sample per il primo lotto pesava 113 grammi mentre per il

secondo e il terzo lotto il peso era 105 grammi. Da questi campioni (rappresentativi dell'intero lotto) si sono prelevati i semi necessari per la preparazione dei campioni di lavoro, e i semi necessari per eseguire tutti i test correlati.



Figura 8, I tre submitted sample come risultato del campionamento.

2.2 TEST DI PUREZZA SPECIFICA

L'obiettivo principale dell'analisi di purezza specifica è determinare la composizione percentuale in peso delle tre componenti principali del campione di lavoro e quindi, per inferenza, la composizione percentuale dell'intero lotto di seme dal quale proviene il campione. Assieme alla frazione di seme puro va determinata l'identità delle varie specie di semi presenti che non siano classificabili come seme puro e le particelle di materiale inerte.

Il seme puro deve fare riferimento alla specie indicata dal richiedente e deve includere le seguenti strutture (ISTA, 2014):

- Unità di seme intatta (anche se si trovano semi immaturi, sottodimensionati, malati o germinati, purché possano essere sicuramente identificati come di quella specie).
- Pezzi di seme più grandi della metà della dimensione originale.

Nella categoria "altri semi" sono inclusi i semi di qualsiasi altra categoria diversa dal seme puro. Il materiale inerte include tutti gli altri materiali e le strutture che non rientrano nella altre due categorie, come semi con dimensioni inferiori alla metà della dimensione originale, ma anche residui della lavorazione come materiale vegetale, esoscheletri di

insetti o parti di essi. L'analisi di purezza è condotta sul campione di lavoro ricavato a seguito di riduzioni dal lotto principale.

La purezza specifica per i campioni di *P. nigra* è stata eseguita su 5 grammi di campione. Il campione di lavoro è stato separato nelle sue tre componenti principali: seme puro, materiale inerte e altri semi (per quanto possibile identificati sul referto di analisi specificando il nome scientifico) (fig.9).



Figura 9, Le tre componenti di un campione di *Populus nigra*. Cotone del pappo, capsule aperte e altri frammenti vegetali fanno parte del materiale inerte mentre i semi (nei due contenitori in basso) fanno parte della frazione di "seme puro".

L'operazione è stata effettuata esaminando a mano ogni singola componente. Per non incorrere in errori durante l'operazione di separazione, è stata consultata la tabella PSD (Pure Seed Definition) per la specie in esame (ISTA, 2014). Tale tabella fornisce una definizione precisa di seme puro per ogni specie; per *P. nigra* è la seguente: seme, con o senza tegumento, con o senza pappo e pezzo di seme più grande della metà della dimensione originale, con o senza tegumento.

Dopo la separazione, per ciascun componente è stato definito il peso. La purezza è stata quindi espressa come percentuale ad una cifra decimale. Una volta ultimate le operazioni di pesatura è stata eseguita una verifica sulla bontà delle operazioni effettuate. Questo controllo consiste nel sommare il peso di tutte le componenti separate e nel comparare il valore ottenuto con il peso originale del campione di lavoro. Se vi è una discrepanza maggiore del 5% rispetto il peso iniziale, è necessario eseguire nuovamente l'analisi di purezza. Per l'analisi di purezza di *Populus nigra* lo scarto non ha mai superato l'1%.

2.3 PESO DI 1000 SEMI

In base al protocollo standard il peso va determinato su un numero costante di semi (1000) e sulla frazione di seme puro proveniente dal test di purezza.

Se i campioni ottenuti sono sufficientemente puri, la conta può essere effettuata attraverso un contatore meccanico.

Poiché i campioni di semi di *Populus nigra* contenevano una frazione elevata di impurità, i semi sono stati contati manualmente, attraverso il metodo delle repliche.

Dal campione di lavoro sono state prelevate otto repliche, ciascuna delle quali composta da 100 semi (fig.10). Ciascuna replica è stata poi pesata con una bilancia analitica, prestando attenzione a mantenere gli stessi decimali utilizzati nell'analisi di purezza.



Figura 10, Le otto repliche da 100 semi del secondo lotto.

Successivamente, è stata calcolata la varianza, attraverso la seguente formula:

$$\text{Varianza} = \frac{N \sum X^2 - (\sum X)^2}{N(N - 1)}$$

Dove:

x = peso di ciascuna replica in grammi

N = numero di repliche

Sulla base della varianza è stata poi calcolata la deviazione standard:

$$s = \sqrt{\text{Varianza}}$$

e infine il coefficiente di variazione (CV):

$$\text{Coefficient of Variation} = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

dove \bar{x} = media del peso di 100 semi.

Se il coefficiente di variazione è ≤ 6 per semi con appendici (propaggini e appigli) e ≤ 4 per gli altri semi, allora può essere calcolato proporzionalmente il peso di mille semi considerando il peso medio delle otto repliche. Se il CV è fuori dai limiti indicati, è necessario contare e pesare altre otto repliche da 100 semi per poi calcolare la deviazione standard considerando tutte le 16 repliche. Sulla base della deviazione standard, vengono quindi scartate tutte le repliche che divergono dalla media del doppio o più della deviazione standard calcolata.

2.4 TEST DI UMIDITA'

Il test di umidità è una parte importante del controllo qualitativo sui semi. Con le informazioni che si acquisiscono dal valore di questo parametro è possibile determinare il momento ottimale per la raccolta, fare le opportune valutazioni per la deidratazione e per la conservazione, nonché valutare la suscettibilità dei semi verso i danni meccanici e verso l'attacco di agenti patogeni, insetti o funghi. Variazioni anche minime nella percentuale di umidità possono avere dunque grandi ripercussioni sull'intero lotto di semi stoccati.

Il contenuto di umidità di un campione è definito come la perdita di peso quando viene deidratato, e viene generalmente espresso come percentuale del peso rispetto al campione originale. I semi esposti all'atmosfera scambiano particelle di acqua con il sistema in cui si trovano, finché il contenuto di umidità del seme e l'umidità relativa dell'aria sono in equilibrio. Tale valore può essere inteso dunque come contenuto di umidità di equilibrio, poiché è generalmente costante per tutte le specie. La percentuale di umidità di un seme può essere determinata sperimentalmente con vari metodi. Il protocollo ISTA indica tre metodi (ISTA, 2014). I primi due metodi prevedono l'utilizzo del forno, e differiscono fra loro per la temperatura applicata e per il tempo di deidratazione. Con il

terzo metodo, l'umidità viene determinata attraverso una termobilancia (fig.11), la quale abbatte notevolmente il tempo del test e risulta essere attendibile come i test eseguiti con i primi due metodi. Per le prove con *Populus nigra* è stata utilizzata una termobilancia.



Figura 11, Termobilancia "Mettler Toledo".

Prima dell'inizio del test, il campione è stato mantenuto a contatto con l'atmosfera del laboratorio per un'ora, in modo da permettergli di entrare in equilibrio con temperatura e umidità relativa del laboratorio. Tutte le operazioni successive hanno richiesto, al contrario, che l'esposizione all'ambiente esterno fosse ridotta al minimo indispensabile.

Concluso il periodo di tempo a contatto con l'atmosfera del laboratorio, il campione è stato accuratamente miscelato con un cucchiaino. Sono stati prelevati complessivamente 2,5 grammi di semi per ciascuno dei tre lotti direttamente dai rispettivi submitted sample. Con lo scopo di assicurare l'omogeneità sono stati effettuati tre prelievi in posizioni diverse del submitted sample, combinati poi per formare il campione da analizzare del peso richiesto. In base alle procedure, non più di due minuti possono intercorrere tra il momento in cui si apre la busta del submitted sample che contiene i semi e la pesa delle repliche.

La termobilancia funziona in modo semiautomatico. Una volta accesa la bilancia è stato caricato un supporto di alluminio vuoto ed è stata poi chiusa, in maniera che acquisisse autonomamente la tara. Successivamente, è stato caricato il campione da analizzare.

A questo punto la lampada alogena comincia il riscaldamento dei semi. La termobilancia raggiunge una temperatura di 103 °C e al termine del processo segnala con un segnale acustico il termine della prova. Sul display compare quindi la percentuale di umidità del

campione, calcolata direttamente dalla bilancia. Per ogni lotto, sono state effettuate due repliche, dalle quali è stata poi calcolata la media aritmetica.

Il protocollo prevede che il campione in eccedenza a fine prova sia conservato in condizioni controllate, all'interno di un contenitore a prova di umidità, per un periodo abbastanza lungo da garantire la possibilità di una ripetizione del test in caso di errori o richieste specifiche.

La differenza massima tra le due repliche di *Populus nigra* non deve superare lo 0,3%. I gradi di tolleranza sono indicati in tabella 2, e come si può notare essi dipendono dalla taglia del seme sottoposto a test e dal contenuto medio di umidità iniziale.

Seed Size	Average initial moisture content		
	<12%	12-25%	>25%
1	2	3	4
Small: TSW<200g	0,3%	0,5%	0,5%
Large: TSW>200g	0,4%	0,8%	2,5%

Tabella 2, Gradi di tolleranza per il test di umidità (ISTA, 2014). TSW= Total Seed Weight.

Se il risultato della due repliche non rispetta i limiti di tolleranza, il test deve essere ripetuto.

2.5 PREPARAZIONE E SPEDIZIONE DEI CAMPIONI

2.5.1 Preparazione delle buste

Una volta eseguiti i test preliminari (Purezza specifica, peso di mille semi, test di umidità) si è proceduto con la preparazione dei campioni che devono essere spediti ai laboratori. Le buste devono essere sufficientemente grandi da contenere la quantità necessaria di semi senza sottometerli a pressione elevata (fig.12). Il materiale di partenza dal quale allestire le buste può essere normale carta ma è possibile anche utilizzare buste in polietilene. In generale ogni altro materiale può essere utilizzato, a patto che non assorba l'umidità residua presente nei campioni. Le buste sono state preparate a mano utilizzando normale carta e sigillate con nastro adesivo.



Figura 12, Busta contenente semi di pioppo pronta per la spedizione.

Semi fragili e molto sensibili come quelli del pioppo, devono essere confezionati e gestiti con molta attenzione. Le buste sono state riempite completamente, in modo che i semi all'interno non potessero muoversi nel corso delle operazioni di spostamento, trasporto e manipolazione. Le buste contenenti i campioni sono state etichettate come segue (fig.13):

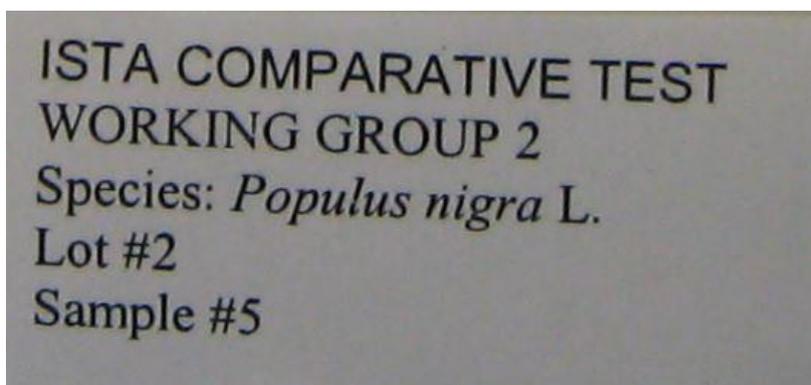


Figura 13, Particolare dell'etichettatura.

Ogni etichetta riportava il nome del test per cui erano stati preparati i campioni, il nome della specie da esaminare, il lotto e il numero del campione.

2.5.2 Preparazione dei campioni

L'obiettivo è preparare campioni conformi allo scopo a cui sono destinati. Questo aspetto è molto importante visto il dispendio di tempo, energie e risorse a cui vanno incontro i laboratori partecipanti per portare a termine il test. È fondamentale che i risultati finali e le informazioni prodotte da ciascun laboratorio siano affidabili e non soggette a cancellazione per sospetti errori nella preparazione dei campioni. La preparazione dei campioni deve assicurare in primo luogo l'omogeneità, in modo che i risultati siano affidabili e non distorti a causa della eterogeneità nei singoli campioni. Deve assicurare inoltre, che i campioni siano sufficientemente robusti in modo da non essere danneggiati durante il trasporto. Il numero totale di campioni necessari è 18, ovvero sei campioni (uno per ogni laboratorio partecipante) per ogni lotto di semi (fig.14).



Figura 14, Panoramica dei 18 campioni totali.

La quantità di semi che ogni campione deve contenere dipende dalla specie, dal suo peso medio, e dai test che devono essere effettuati. *Populus nigra* rientra nella categoria dei semi di piccole dimensioni (più di 100.000 semi/kg, TSW<10g) mentre il test che verrà eseguito è quello della germinazione.

Per l'esecuzione di questa prova su substrato cartaceo e acquoso, sono necessari almeno 2400 semi per campione. Vista la presenza di materiale inerte nei lotti e la difficoltà oggettiva di contare manualmente 2400 semi, per raggiungere tale quantità ci si è basati sul peso utilizzando i dati provenienti dal peso di mille semi. Ogni campione è stato pesato

dunque in maniera tale da contenere il peso corrispondente a 2500 semi puri di pioppo, numero arrotondato per evitare ogni genere di problema di quantità.

Considerando ad esempio che nel primo lotto 1000 semi puri pesano 0,4 grammi proporzionalmente 2500 semi peseranno circa 1 grammo. Per la preparazione di ciascuno dei 6 campioni del primo lotto è stato prelevato quindi un grammo di semi dal submitted sample. Nel secondo e nel terzo lotto 1000 semi pesano 0,6 grammi per cui 2500 semi peseranno 1,5 grammi. Dunque i 12 campioni del secondo e del terzo lotto peseranno ciascuno 1,5 grammi. Per assicurare l'omogeneità, il prelievo è stato effettuato in più punti del submitted sample, fino a raggiungere il peso indicato. Per evitare ogni genere di errore durante la preparazione, i campioni sono stati preparati, confezionati e etichettati lotto per lotto.

Spedizione campioni

Una volta pronti, sono stati consegnati a mano tre campioni a ciascuno dei seguenti laboratori (fig.15):

UNIBO– LaRAS Laboratorio di ricerca e analisi sementi. Viale G. Fanin, 40 40127 Bologna.

CRA-SCS Via Emilia km307 26838 Tavazzano (LO).

CRA-SCS Via Cà Nova Zampieri 37 37057 S. Giovanni Lupatoto (VR).

UNIFI – LABORATORIO SEMI Via S. Bonaventura, 13 50145 Firenze.

CNBF di Pieve S.Stefano (AR) Loc. Riolo - Via Pian di Guido, 23 52036 Pieve S. Stefano (AR).

A tale lista va aggiunto il CNBF di Peri (Vr), struttura incaricata per la preparazione dei campioni.

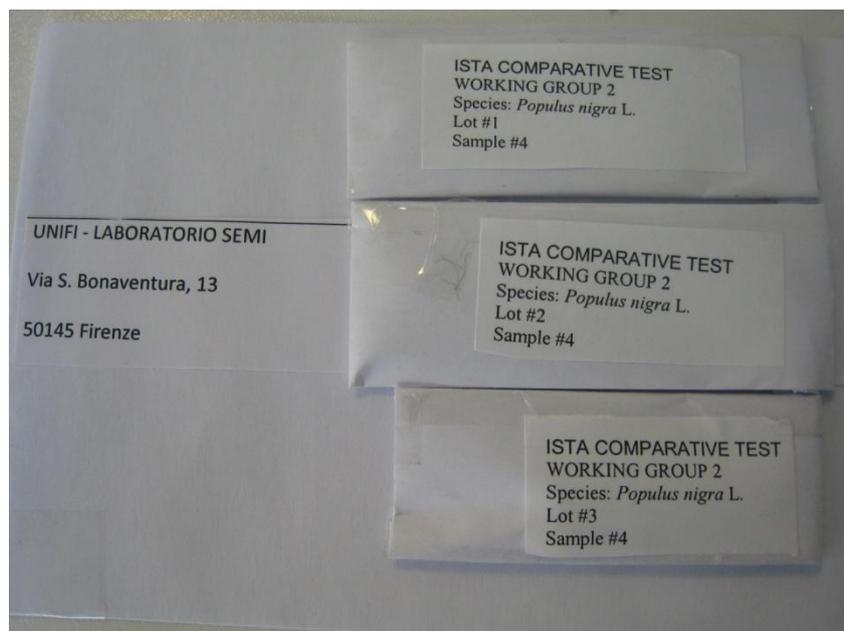


Figura 15, Tre campioni pronti per la consegna.

2.6 TEST DI GERMINAZIONE

L'International Seed Testing Association (ISTA, 2014) definisce la germinazione come "la nascita e lo sviluppo della piantina ad una fase in cui l'aspetto delle sue strutture essenziali indica se è in grado di sviluppare ulteriormente in una pianta soddisfacente in condizioni favorevoli". Lo scopo della prova di germinazione è determinare il potenziale germinativo di un lotto. Tale parametro può essere anche usato per confrontare la qualità e stimare il valore economico di un lotto. Il test di germinazione è infatti considerato come il più importante parametro nella valutazione qualitativa su semi. Dato che le prove di germinabilità effettuate in campo non sono di norma soddisfacenti e che i risultati non possono essere riprodotti con affidabilità, sono state concepite metodologie di laboratorio in cui i fattori esterni sono controllati per dare una germinazione rapida, completa e uniforme. Le tecniche utilizzate in laboratorio sono state con il tempo standardizzate per consentire la riproduzione, l'affidabilità e l'uniformità dei risultati del test.

Definizione

La germinazione consiste nella nascita e nello sviluppo di un germinello ad una fase in cui l'aspetto delle sue strutture principali indica se è in grado, in condizioni favorevoli, di svilupparsi ulteriormente in una pianta adulta sana. Con il termine strutture principali o essenziali si intende: un apparato radicale e un sistema aereo ben sviluppato e intatto e uno, due o più cotiledoni a seconda delle specie (ISTA, 2014). I semi impiegati in un test di

germinazione non possono essere valutati fino a quando queste strutture non sono chiaramente identificabili e valutabili. La percentuale di germinazione esprime la percentuale di semi che hanno prodotto germinelli normali sul totale campioni dei semi testati entro il termine stabilito per ciascuna specie.

Un germinello (fig. 16), a seconda della specifica fase del test, è costituito da una combinazione specifica di alcune delle seguenti strutture che sono essenziali per il suo successivo sviluppo in una pianta normale:

- Sistema aereo: gemma terminale (1), foglie primarie (2), epicotile (3) e ipocotile (5).
- Cotiledoni: uno, due o molti (4)
- Sistema radicale: radice principale (6)

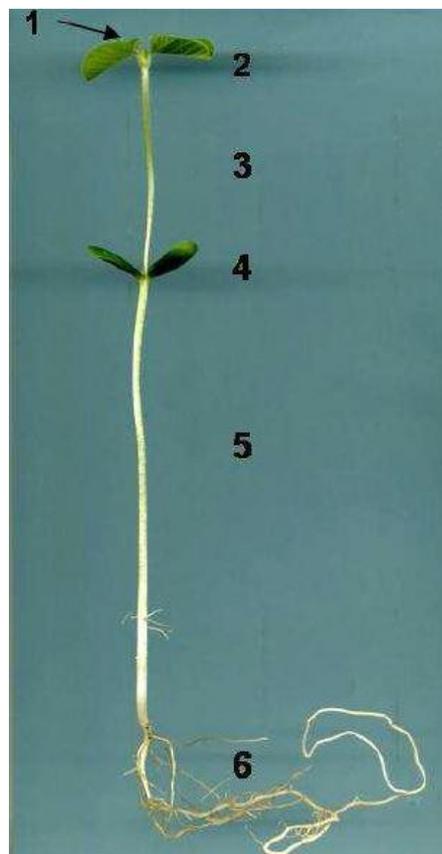


Figura 16, Germinello con tutte le strutture essenziali sviluppate (ENSE Tavazzano, 2008).

Principi generali

Le prove di germinazione devono essere effettuate con i semi dalla frazione di seme puro proveniente dall'analisi della purezza. Un minimo di quattrocento semi vengono testati in quattro repliche da 100 semi ciascuno o, in alternativa, otto repliche da 50 o 16 repliche da 25, a seconda delle dimensioni dei semi e dei contenitori del substrato (ISTA, 2014).

Per poter essere utilizzati in un test di germinazione i semi non devono ricevere alcun trattamento preliminare. I semi, disposti in repliche, vengono testati in condizioni di umidità favorevoli e secondo le modalità previste dalle regole ISTA. Dopo un periodo di tempo che varia da specie a specie deve essere effettuata la lettura del test. I semi vengono dunque esaminati e conteggiati in base allo stato in cui si presentano.

Per un corretto test di germinazione sono richieste determinate condizioni. I requisiti più importanti sono: substrato, umidità, temperatura e luce.

Umidità

L'umidità viene fornita ai semi attraverso il substrato. Una alta concentrazione di acqua è fondamentale al seme per iniziare il processo di germinazione però la presenza eccessiva favorisce la crescita di funghi e il marciume. Le caratteristiche generali per l'acqua con la quale bagnare il substrato sono: assenza di impurità organiche o inorganiche, pH compreso nell'intervallo tra 6 a 7.5, salinità più bassa possibile o comunque non superiore a 40 millisimens/m (ISTA, 2014). Se l'acqua potabile presente normalmente in laboratorio non rispetta le specifiche sopra riportate, può essere utilizzata acqua distillata o deionizzata. Per assicurarsi della qualità dell'acqua utilizzata dovrebbero essere condotte frequentemente analisi di controllo.

Temperatura

La germinazione si verifica in diverse gamme di temperature a condizione che il seme sia vitale e che vi sia una adeguata umidità. Mentre l'umidità è un requisito fondamentale per la germinazione, la temperatura non rappresenta un parametro critico in quanto la maggior parte dei semi germina nel range di temperature comprese fra 20 e 30 °C (ISTA, 2014). Tuttavia, i germinatoi vengono posti all'interno di un armadio climatico, dove la temperatura viene mantenuta possibile costante, con variazioni che non devono essere maggiori di 2 gradi.

Luce

Nonostante il comportamento dei semi sia specie-specifico, la presenza di luce è auspicabile per consentire un migliore sviluppo del germinello e per assicurare in seguito una lettura del test facile e accurata (ISTA, 2014). L'illuminazione del substrato da parte di sorgenti artificiali o dalla luce naturale è raccomandata per un migliore sviluppo del germinello e per evitare l'allungamento delle sue strutture e la clorosi. Raccomandazioni

specifiche per la luce o l'oscurità per ogni specie sono comunque riportati nella regola ISTA.

Substrato di coltivazione

I substrati fungono da serbatoio di umidità ed aria e forniscono una superficie in cui i semi possono germinare e le piantine crescere. I substrati comunemente usati sono di carta, sabbia e terra (ISTA, 2014).

Substrato cartaceo: La maggior parte dei supporti cartacei utilizzati sono composti da carta assorbente, questi substrati sono facili da maneggiare, versatili e relativamente economici. Il substrato cartaceo deve essere tale che le radici del seme in germinazione crescano sopra la carta e non all'interno, inoltre deve possedere sufficiente forza per resistere agli strappi e alle sollecitazioni quando viene manipolata durante il test. Si possono individuare numerosi metodi che prevedono l'utilizzo di carta.

-TP (Top of Paper): I semi sono posti direttamente su uno o più strati di carta umida o assorbente, posta all'interno di capsule di Petri o germinatoi di plastica. Questi contenitori, assieme al coperchio vengono poi collocati all'interno dell'armadio climatico. L'umidità relativa all'interno dell'armadio deve essere mantenuta attorno al 95-99% per evitare l'essiccazione durante il periodo di prova.

-BP (Between Paper): I semi germinano fra due strati di carta sovrapposti.

-PP (Pieghe di carta): I semi sono posti in strisce di carta disposte a pieghe. La carta può avere un numero variabile di 5-10 pieghe, con ciascuna piega contenente fino a 10 semi. Le strisce a pieghe sono poste in contenitori di plastica con acqua al fine di garantire condizioni uniformi di umidità. Questo metodo può essere usato in alternativa ai primi due sopra descritti.

Substrato sabbioso: La granulometria della sabbia deve essere uniforme e libera dalle particelle più grandi e più piccole. La sabbia che è stata usata per testare campioni trattati chimicamente dovrebbe preferibilmente essere eliminata. Se invece si desidera utilizzarla nuovamente occorre verificare che i prodotti chimici che possono essersi accumulati all'interno non causino sintomi fitotossici. In tutti i casi è consigliabile lavare e/o sterilizzare la sabbia prima dell'uso.

I metodi che prevedono l'utilizzo di un substrato sabbioso sono:

-TS (Top of Sand) o TO (Top of Organic): I semi vengono posti su di una superficie sabbiosa o su del substrato organico.

-S (Sand) o O (Organic medium): I semi sono seminati all'interno di uno strato livellato di sabbia umida, tale strato viene poi coperto con altri 10-20mm di sabbia a seconda della dimensione del seme. Per garantire una buona aerazione è consigliabile che lo strato sabbioso inferiore non sia troppo compatto, ed è quindi necessario smuoverlo manualmente prima della semina.

Terreno: Il suolo non è generalmente raccomandato come terreno di coltura. Tuttavia, può essere usato in alternativa ai normali substrati di coltivazione nel caso in cui i germinelli mostrino sintomi fitotossici o se la lettura del test è in dubbio. Il suolo deve essere di buona qualità e privo di particelle di grandi dimensioni. Deve essere inoltre ragionevolmente esente da semi di altre specie, batteri, funghi, nematodi o da sostanze tossiche che possono interferire con la germinazione dei semi, la crescita delle strutture essenziali e la lettura del test. Il suolo deve consentire un'adeguata aerazione, tale substrato non è raccomandato per il riutilizzo.

Durata della prova

La durata della prova varia per ogni specie. La procedura con la quale avviene è invece costante, sono infatti previste due letture/conteggi durante l'esecuzione del test (ISTA, 2014). Il primo conteggio deve essere effettuato nel momento in cui i germinelli hanno raggiunto uno stadio di sviluppo che consente la valutazione accurata. Questa lettura è necessaria anche per rimuovere quei germinelli che sono sufficientemente sviluppati, ciò rende più facile il conteggio e impedisce di influenzare lo sviluppo di altri semi in corso di germinazione. La seconda lettura coincide con la conclusione del test. Al termine della seconda (e ultima) lettura si avrà una classificazione generale dello stato dei campioni, che saranno catalogati come di seguito (ISTA, 2014):

-Germinelli normali: I germinelli normali sono quelli che mostrano la capacità di uno sviluppo in pianta matura in condizioni favorevoli di umidità, temperatura e luce. La capacità di sviluppo dipende dal grado di salute dei tessuti e dal corretto funzionamento delle strutture essenziali durante la germinazione. Per essere classificati come normali, i semi che germinano deve essere conformi ad una delle seguenti categorie (ISTA, 2014):

(a) germinelli intatti: germinelli con tutte le strutture essenziali ben sviluppate, complete in ogni proporzione e sane. Le strutture essenziali che vengono valutate per definire un seme germinato come normale sono:

-Sistema radicale. La radice primaria deve essere intatta o mostrare difetti accettabili come macchie scolorite o necrotiche, crepe e spaccature cicatrizzate, crepe superficiali e spaccature.

-Sistema aereo. L'ipocotile deve essere intatto o mostrare difetti accettabili come macchie scolorite o necrotiche
crepe e spaccature cicatrizzate, crepe superficiali e spaccature.

-Gemma terminale e tessuti circostanti. I cotiledoni devono essere intatti o presentare difetti accettabili come il 50% del tessuto non funzionante normalmente, un solo cotiledone intatto o tre cotiledoni presenti.

(b) germinelli con lievi difetti: I germinelli mostrano alcune lievi difetti delle loro strutture essenziali.

(c) germinelli con infezioni secondarie: germinelli che sono gravemente infettati da funghi o batteri sono classificati come normali se è evidente che il seme stesso non è la fonte di infezione e se tutte le strutture essenziali sono presenti.

-Germinelli anormali: Un germinello anormale non ha la capacità di portare alla formazione di una pianta normale in condizioni ambientali favorevoli poiché una o più delle sue strutture essenziali sono irrimediabilmente compromesse (ISTA, 2014).

In particolare una o più delle seguenti strutture è anormale se:

-Sistema radicale. La radice primaria presenta difetti e/o ritardi nello sviluppo, è mancante, è rotta o esile, è intrappolata nel tegumento del seme o presenta geotropismo negativo.

-Sistema aereo. L'ipocotile è difettoso se è corto e grosso, è incurvato o rotto, è mancante o forma una spirale.

-I cotiledoni sono difettosi se danneggiati a tal punto che meno del 50% del tessuto originale funziona normalmente, sono gonfi o arricciati, sono deformati, sono rotti o comunque danneggiati, sono separati o mancanti, sono scoloriti o necrotici. Si possono quindi individuare tre classi principali di semenzali anormali (ISTA, 2014):

-Germinelli danneggiati: germinelli con una qualsiasi delle strutture essenziali mancanti o danneggiate così gravemente che non vi può essere ulteriore sviluppo. I danni

all'embrione del seme derivano solitamente da cause esterne come la movimentazione meccanica, calore, siccità o danni da insetti.

-Germinelli deformati o non strutturalmente bilanciati: germinelli con uno sviluppo debole e squilibrato, che può essere causato da anomalie di carattere fisiologico e/o biochimico. Tali disordini interni sono spesso causa di disturbi precedenti che avvengono all'esterno, come non favorevoli condizioni di crescita delle piante madri, cattive condizioni di maturazione per il seme, raccolta precoce, effetto di erbicidi o pesticidi e condizioni di conservazione inappropriate o invecchiamento del seme .

-Germinelli con una qualsiasi delle strutture essenziali così compromessa da una infezione primaria (malattia presente e attiva nel seme stesso) che lo sviluppo normale è impedito.

-Semi non germinati: I semi non germinati entro la fine del periodo di prova durante il test nelle condizioni previste sono classificati come segue (ISTA, 2014):

- Semi duri: I semi che non assorbono l'umidità fino alla fine del periodo di prova e restano duri al tatto.

- Semi freschi: Semi che non sono né duri né germinati ma rimangono in buone condizioni e apparentemente vitali al termine del periodo di prova e che sono in grado di assorbire acqua ma la germinazione è bloccata. La vitalità dei semi freschi può essere determinata mediante test al tetrazolo.

- Semi morti: Semi che al termine del periodo di prova non sono né duri né freschi né hanno prodotto alcuna parte di un germinello. Spesso il seme morto collassa in una pasta lattiginosa quando viene premuto.

- Semi vuoti: semi che sono completamente vuoti (assenza di embrione) o che contengono solo residui di tessuti.

Calcoli e espressione dei risultati

I risultati del test di germinazione sono espressi come percentuale dei semi normali, anormali, duri, freschi e morti e vuoti. La percentuale è arrotondata al numero intero più vicino. La somma delle percentuali dei semi normali e anormali deve essere 100.

2.6.1 Test di germinazione su *Populus nigra*

La prova principale per la determinazione qualitativa di un lotto riguarda il test di germinazione, è importante sottolineare che le prove hanno la stessa data di inizio e di fine per tutti i laboratori e che le condizioni del test sono le medesime. Parte del test è stato condotto utilizzando il substrato principale per i test di germinazione cioè la carta assorbente, considerando però le caratteristiche ecologiche del pioppo la prova è stata ripetuta utilizzando come substrato acqua distillata. Il numero di semi testati è di 1200 sia per il test su carta sia su acqua, per un totale di 2400 semi.

Substrato-Carta

Campione: 1200 semi totali (400 semi per ciascuno dei 3 campioni). I 400 semi sono stati suddivisi in quattro repliche da 100 semi.

Substrato: (TP=Top of Paper). Carta assorbente posta all'interno di un germinatoio di plastica, sigillato attraverso l'uso di cotone che impedisce all'umidità di uscire durante la durata del test.

Quantità di acqua: all'interno di ogni germinatoio sono stati versati 30 ml di acqua distillata.

Preparazione dei germinatoi

I germinatoi sono costituiti da tre parti: il contenitore di plastica, il suo coperchio provvisto di un foro centrale dove è stato posto del cotone per evitare la dispersione di umidità, e un supporto interno dove sono stati posizionati i semi. Per la preparazione del germinatoio è stato sistemato sul supporto interno un pescante, costituito da carta assorbente che favorisce la risalita di acqua per capillarità sul supporto stesso. Le strisce di carta che compongono un pescante devono quindi toccare il fondo del germinatoio. Sopra al pescante è stata posizionata la carta assorbente di forma circolare a cui sono stati aggiunti 30 ml di acqua distillata prestando attenzione ad inumidire uniformemente tutta la carta. Ogni germinatoio è stato etichettato riportando il numero dell'analisi, il numero del lotto e la lettera dell'alfabeto che distingue le 4 repliche (fig.17).



Figura 17 Germinatoi pronti per essere utilizzati.

I semi sono stati prelevati dai campioni preparati in precedenza, per ogni campione servono 400 semi disposti in 4 germinatoi ognuno contenente 100 semi (fig.18). I semi vengono posti uniformemente sopra il pezzo di carta assorbente inumidita, evitando che si tocchino fra di loro per evitare fenomeni di disturbo o di contagio di natura fungina. Al termine di tale operazione si avrà un totale di 12 germinatoi.

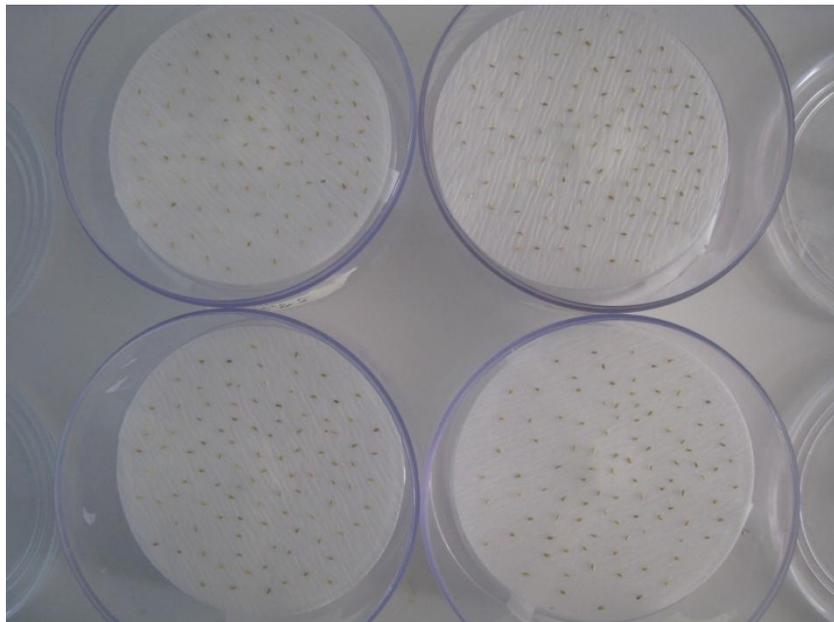


Figura 18, Germinatoi con semi di *Populus nigra* pronti per l'inizio del test.

Una volta chiusi, i germinatoi sono stati posizionati all'interno dell'armadio climatico a temperatura costante di 20-30 °C come indicato da protocollo. Per i semi di pioppo è prevista una prima lettura a tre giorni dall'inizio del test ed un'ultima conta al decimo giorno del test. Durante la prima levata sono stati conteggiati i germinelli normali e quei semi che hanno mostrato marciume e/o presenza di muffe. Sia i germinelli normali sia i semi ammuffiti sono stati tolti dal germinatoio. I semi rimanenti, non ancora geminati ed in buone condizioni, restano nel germinatoio fino alla conclusione del test, al termine del quale sono stati effettuati i calcoli e le valutazioni del caso.

Substrato-Acqua

Campione: 1200 semi totali (400 semi per ciascuno dei 3 campioni). I 400 semi sono stati suddivisi in quattro repliche da 100 semi.

Substrato: Acqua

Quantità di acqua: 50, 100, 150 ml a seconda del contenitore.

Oltre al test di germinazione standard condotto seguendo il protocollo ISTA, è stata testata sperimentalmente la germinazione dei semi di pioppo utilizzando come medium l'acqua. Per queste prove sono stati usati diversi contenitori allo scopo di valutare la differente risposta germinativa dei semi.

Per il primo lotto è stato utilizzato un supporto di vetro sprovvisto di coperchio, mentre per il secondo e terzo lotto sono stati usati contenitori di plastica. In particolare per il secondo lotto è stata usata la parte inferiore di un normale germinatoio mentre per il terzo lotto una petri di plastica sprovvista di coperchio (fig.19).

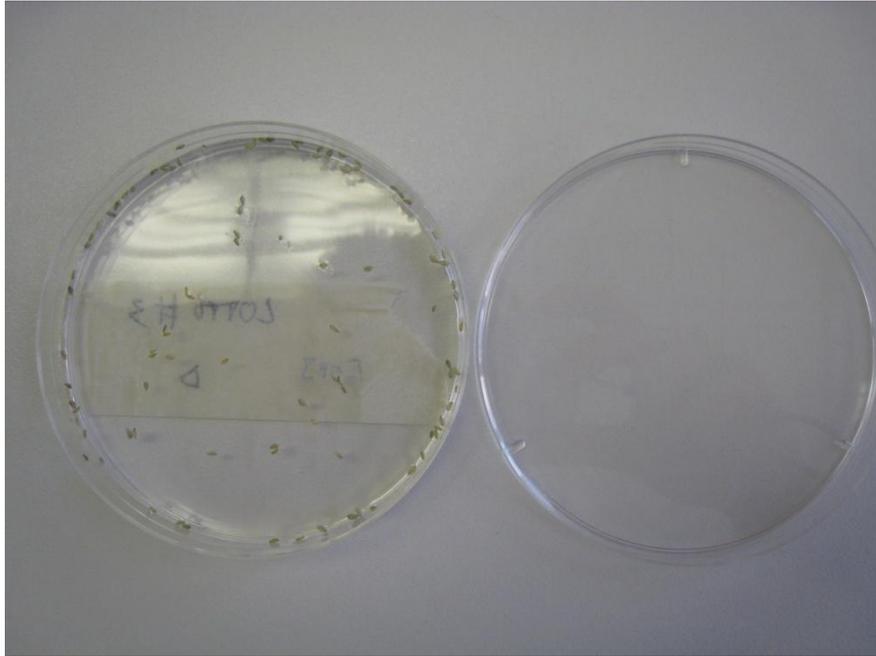


Figura 19, Petri di plastica con semi del terzo lotto.

Sono stati dunque versati all'interno di questi contenitori rispettivamente 150, 100 e 50 ml di acqua distillata. La differenza nel volume di acqua deriva dalla differente dimensione dei supporti, il supporto di vetro del primo lotto è infatti più grande rispetto agli altri e dunque necessita di più acqua per coprire l'intera superficie. Vista l'assenza di coperchi o di altri espedienti utilizzati per impedire la fuga di umidità, è stato necessario controllare giornalmente la quantità di acqua presente nei contenitori. Nel contenitore di vetro del primo lotto a metà circa del test sono stati aggiunti 30 ml di acqua poiché quella utilizzata ad inizio prova era in esaurimento.

I semi di pioppo, sempre prelevati dai campioni precedentemente preparati vengono disposti direttamente sull'acqua. Il numero di semi testati è sempre 400 per ogni campione, anche il tempo di durata del test e le condizioni di temperatura sono le medesime per cui anche queste prove sono state portate all'interno di un armadio climatico a temperatura costante di 20-30 °C. Il primo conteggio dei semi è stato fatto dopo tre giorni dall'inizio della prova, la seconda e ultima conta dopo dieci giorni.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 PESO DI MILLE SEMI

Vengono riportati di seguito i risultati del peso delle repliche per ciascun lotto e i risultati della determinazione del peso di 1000 semi (tab.3).

Dalla determinazione del peso è risultato che i semi di *Populus nigra* del primo lotto pesano leggermente di meno (0,4 grammi) rispetto ai semi dei lotti 2 e 3 (0,6 grammi).

Si tratta comunque di variazioni minime, dato che l'unità di misura riferendosi al peso medio delle repliche, è il centesimo di grammo.

La determinazione del coefficiente di variazione (CV) ha rivelato che il peso finale determinato è da considerarsi valido per tutti i lotti, essendo sempre inferiore a 6.

Come riportato nei materiali e metodi, dai risultati del peso medio di 1000 semi è stato determinato in maniera proporzionale il peso necessario per ogni campione in via di preparazione.

	LOTTO#1	LOTTO#2	LOTTO#3
Peso medio delle otto repliche	0,04 grammi	0,06 grammi	0,06 grammi
Peso medio di 1000 semi	0,4 grammi	0,6 grammi	0,6 grammi
Varianza	0,000006234	0,000009394	0,000008823
Deviazione Standard	0,002496712	0,00306501	0,002970299
Coefficient of Variation	5,830034 < 6	4,853539 < 6	5,260659 < 6

Tabella 3, Risultati della determinazione del peso di mille semi.

3.2 TEST DI PUREZZA SPECIFICA

Vengono riportati di seguito i risultati del test di purezza specifica per ogni lotto (tab. 4).

Dall'analisi di purezza è emerso che i tre lotti presentano una quantità considerevole di materiale inerte, le cui percentuali in peso sono rispettivamente del 10,0%, 11,0% e 10,8%. Questi valori sono causati dalle difficoltà riscontrabili nella pulizia dei semi di pioppo. La maggior parte del processo di lavorazione si concentra nella eliminazione del cotone e del pappo, mentre, il materiale inerte, essendo di dimensioni analoghe ai semi è di difficile asportazione, e per questo resta all'interno del campione. In fig. 20 è rappresentato un campione di semi di pioppo non puro: i semi sono di colore bianco/giallo mentre il materiale inerte è quello con colorazione marrone. Non è stata riscontrata la presenza di altri semi nel campione di lavoro analizzato, dunque la percentuale di purezza è per il primo lotto del 90%, per il secondo dell' 89% e per il terzo dell' 89,2%.



Figura 20, Campione di sementi di *Populus nigra*.

	LOTTO#1	LOTTO#2	LOTTO#3
Seme puro	90%	89%	89,2%
Materiale Inerte	10%	11%	10,8%
Altri Semi	/	/	/

Tabella 4, Risultati test purezza specifica

3.3 TEST DI UMIDITA'

Di seguito i risultati del test di umidità (tab. 5).

La lavorazione di *Populus nigra*, come è stato riportato, prevede sostanzialmente l'eliminazione del cotone, del pappo e delle impurità più grossolane. Oltre a queste operazioni, i semi dei lotti analizzati, hanno subito una deidratazione a temperatura ambiente. Alla raccolta, i semi di *Populus nigra*, classificati come appartenenti alla categoria delle specie intermedie per contenuto di umidità, possiedono un contenuto di umidità del 15% circa. Secondo Simak (1980) per mantenere la vitalità dei semi di pioppo a lungo termine sono importanti trattamenti di deidratazione subito dopo la raccolta del seme, che portino il seme ad un contenuto di umidità finale tra il 6% e il 10%. In accordo a tale studio, i lotti di pioppo sono stati deidratati alla temperatura di 20°C, con lo scopo di abbassare il contenuto di umidità, fino a portarli al 9,3%, 9,9% e 10% (tab.6), rientrando quindi nell'intervallo di umidità dei semi ortodossi.

n°LOTTO	Contenuto % di umidità
1	9,3
2	9,9
3	10

Tabella 5, Risultati test di umidità.

3.4 TEST DI GERMINAZIONE

In tabella 6 e 7 vengono riportati i risultati del test di germinazione ottenuti dai diversi laboratori. In Appendice 1 sono riportati i risultati completi del test di germinazione su substrato cartaceo e su acqua, suddivisi per laboratorio.

I risultati di germinazione normale sono in molti casi zero poiché la totalità dei semi testati sia nelle prove su carta sia nelle prove su acqua sono ammuffiti, ovvero sono arrivati al decimo e ultimo giorno di test non ancora germinati e/o attaccati da muffe. Pertanto la percentuale di germinelli normali è zero, ma va comunque considerata nel calcolo della media finale.

Riepilogo Risultati		Substrato=Carta		
n° Lotto	LOTTO#1 LOTTO#2 LOTTO#3			
	% Normal Sdlgs			
LABORATORIO 1	0	6	7	
LABORATORIO 2	1	13	16	
LABORATORIO 3	0	3	4	
LABORATORIO 4	0	5	4	
LABORATORIO 5	0	0	0	
LABORATORIO 6	0	0	0	
Mean	0	5	5	

Tabella 6, Riepilogo risultati (Substrato carta).% Normal Sdlgs= Percentuale di germinelli "normali".

Riepilogo Risultati		Substrato=Acqua		
n° Lotto	LOTTO#1 LOTTO#2 LOTTO#3			
	% Normal Sdlgs			
LABORATORIO 1	0	4	5	
LABORATORIO 2	1	4	5	
LABORATORIO 3	1	7	5	
LABORATORIO 4	0	0	1	
LABORATORIO 5	0	0	0	
LABORATORIO 6	0	0	0	
Mean	0	3	3	

Tabella 7, Riepilogo risultati (Substrato acqua). % Normal Sdlgs= Percentuale di germinelli "normali".

I risultati del test di germinazione su *Populus nigra* delineano un quadro ben preciso, in quanto i tre lotti mostrano una bassissima percentuale di germinelli normali (fig.21). Questo porta a fare ulteriori considerazioni. Nelle prove su carta (tab. 7), considerando i risultati di tutti i laboratori, la media dei germinelli normali del primo lotto si attesta allo 0% mentre per il secondo e il terzo al 5%. Nelle prove utilizzando l'acqua come substrato (tab. 8), la media del primo lotto resta dello 0% per poi alzarsi al 3% per gli altri due lotti. Non si possono individuare quindi differenze sostanziali fra le prove di germinazione su carta e quelle su acqua.

I risultati su substrato acquoso rivelano inoltre che il materiale e la grandezza del contenitore del substrato e dei semi non condiziona la percentuale di germinazione.



Figura 21, Germinelli normali.

In generale si può affermare che nella maggior parte dei casi i semi non germinati appartengono alla categoria dei semi ammuffiti. Percentuali minori di semi germinati in maniera anormale o vuoti si riscontrano a seconda del campione e del laboratorio che ha eseguito l'analisi. In alcuni campioni dei lotti 2 e 3 si è verificata la germinazione delle sole foglie cotiledonari (fig.22). Questo tipo di germinelli è classificato fra i semi germinati anormalmente.

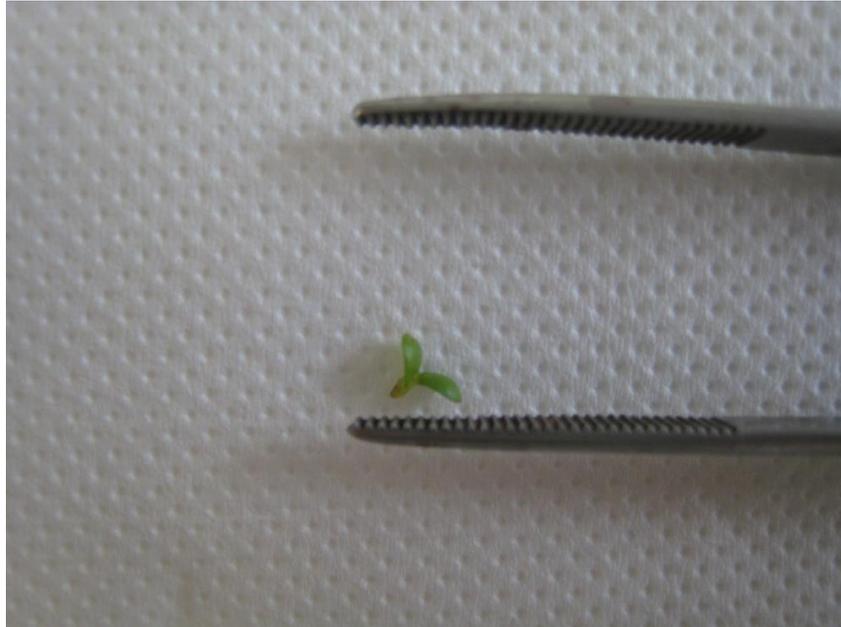


Figura 22, Germinello anormale.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro effettuato ha contribuito a confermare che la gestione del seme di pioppo è molto difficile.

Un primo problema riguarda la finestra temporale in cui si può raccogliere il seme maturo che è molto breve in quanto in pochi giorni si passa da seme immaturo alla dispersione dello stesso nell'aria. Il momento ottimale per la raccolta del seme è appena prima che lo stesso cominci a disseminare naturalmente, ma quando il frutto si apre è ormai troppo tardi ed il seme si disperde nell'aria.

Un secondo problema sembra poi essere l'estrazione del seme dal frutto. È necessario fare molta attenzione nella rimozione della lanugine in modo da non danneggiare le strutture seminali rendendo di fatto il seme non vitale. Il "cotone", infatti, è molto ingombrante e soprattutto mantiene alta l'umidità del seme impedendone la corretta conservazione, e va quindi rimosso.

Per quanto riguarda le fasi successive, la scarsa germinabilità riscontrata in questo lavoro potrebbe essere imputata ad una cattiva lavorazione dei lotti che ha portato ad un deperimento immediato del germoplasma. Normalmente infatti il seme di pioppo ha una germinazione molto elevata (sopra il 90%), soprattutto nel substrato acqua, come dimostrano i test di germinazione effettuati nella annata silvana scorsa (fig. 23). Ciò significa che sono necessari ulteriori approfondimenti per meglio capire la gestione e la

conservazione del germoplasma di una specie così delicata e che in natura comunque si propaga per seme.

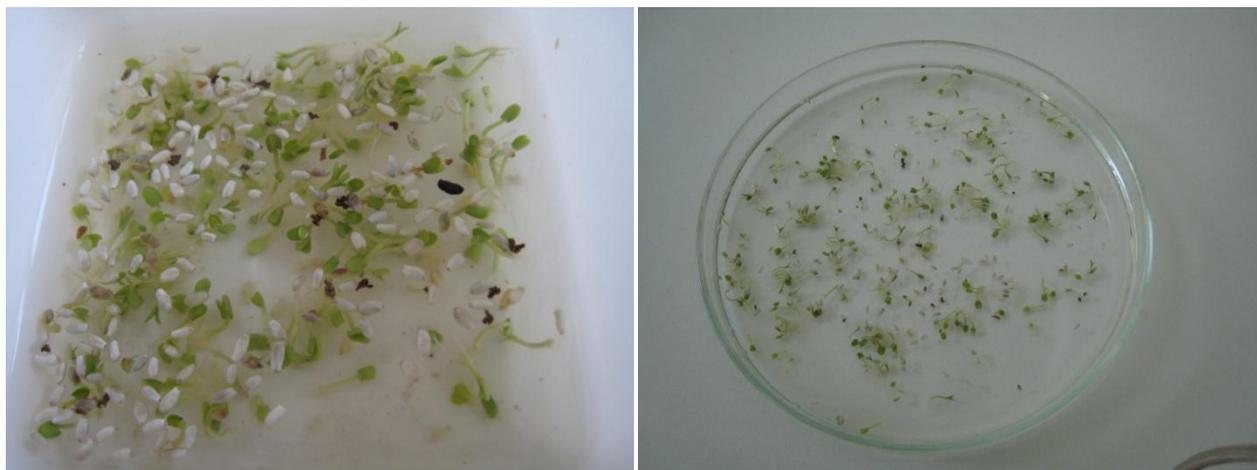


Figura 23, Test di germinazione su *Populus nigra*. Annata silvana 2013/14

BIBLIOGRAFIA

Asakawa S., 1980. Storage of *Populus maximowiczii* seeds. In: Proceedings, International Symposium on Forest Tree Seed Storage; 1980 September 23B27; Chalk River ON. Ottawa: Canadian Forestry Service: 136B141.

Attucci S., Carde J.P., Raymond P., Saint-Ges V., Spiteri A., Pradet A., 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiol* 95: 390–398

Barroco R. M., Van Poucke K., Bergervoet J. H. W., De Veylder L., Groot S. P. C., Inze D., and Engler G., 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol.* 137:127–40.

Baskin C. C., and Baskin J. M., 1998. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. New York: Academic Press.

Benson M.K., Harder M.L., 1972. Storage of aspen seed. *Genetics and Physiology Notes* 11. Institute of Paper Chemistry. 4 p.

Bewley J. D., 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Bewley J. D., and Black M., 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.

Bonner F. T., Karrfalt R. P., 2008. *The Woody Plant Seed Manual*.

Braatne J.H., Rood S.B., Heilman P.E., 1996. Life history, ecology, and reproduction of riparian cottonwoods in North America. In: Stettler, R.F., Bradshaw Jr., H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (Eds.): *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp. 57–85.

Brown KR., 1989. Catkin growth, seed production, and development of seed germinability in quaking aspen in central Alberta. *Tree Planters= Notes* 40(20): 25B29.

Corbineau F., and Côme D., 1989. Germination and storage of recalcitrant seeds of some tropical forest tree species. *Ann. Sci. Forestières* 46, 89s-91s.

Dickmann D.I., Stuart K.W., 1983. *The culture of poplars in eastern North America*. East Lansing: Michigan State University, Department of Forestry. 168 p.

Ehrenshaft M., and Brambl R., 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol.*

Ellis R.H., Hong T.D., Roberts E.H., 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *J. Exp. Bot.* 41:1167-1174

Ellis R.H., and Roberts E.H., 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Ann. Botany* 45, 13-30.

EUFORGEN., 2015. Distribution map of Black poplar (*Populus nigra*). www.euforgen.org.

- FAO/IPGRI., 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italy
- Farmer R.E., Bonner F.T., 1967. Germination and initial growth of eastern cottonwood as influenced by moisture stress, temperature, and storage. *Botanical Gazette* 128 (3/4): 211B215.
- Farrant J.M., Pammenter N.W., Berjak P., 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiologia. Plantarum* 67:291-298.
- Faust M.E., 1936. Germination of *Populus grandidentata* and *P. tremuloides*, with particular reference to oxygen consumption. *Botanical Gazette* 97: 808B821.
- Fechner G.H., Burr K.E., Myers J.F., 1981. Effects of storage, temperature, and moisture stress on seed germination and early seedling development of trembling aspen. *Canadian Journal of Forest Research* 11: 718B722.
- Fung M.Y.P, Hamel B.A., 1993. Aspen seed collection and extraction. *Tree Planters= Notes* 44(3): 98B100.
- Graham S.A., Harrison R.P., Westell C.E., 1963. *Aspens, phoenix trees of the Great Lakes Region*. Ann Arbor: University of Michigan Press. 272 p.
- Harder M.L., 1970. Procedures for collection and extraction of *Populus* seed. *Institute of Paper Chemistry, Genetics and Physiology Notes* 9: 1B3.
- Hartmann H. T., Kester D. E., Davies F. T., Geneve R., 2010. *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices* (8th Edition).
- Herner R. C., 1986. Germination under cold soil conditions. *HortScience* 21(5):1118–22.
- Herpka I., 1986. A survey on development and possibilities of growing: natural forest of poplars and willows. In: *Poplars and willows*. Poplar Research Institute, Novi Sad, pp. 21–36.
- Hong T.D., Linington S., Ellis R.H., 1998 – *Compendium of information on seed storage behaviour, I: A-H*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hong T.D., Linington S., Ellis R.H., 1996. *Seed Storage Behaviour: a Compendium*. Handbooks for Genebanks No. 4. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Hosner J.F., 1957. Effects of water upon the seed germination of bottomland trees. *Forest Science* 3(1): 67B70.
- International Rules for Seed Testing., 2014. Adopted at the Ordinary General Meeting 2013, Antalya, Turkey. Effective from 1 January 2014.
- Jann R. C., and Amen R. D., 1977. What is germination? In A. A. Khan, ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam: North-Holland Publishing. pp. 7–28.

- Karrenberg S., Edwards P.J., Kollmann J., 2002. The life-history of Salicaceae living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biology*, 47: 733–748.
- King M.W., and Roberts E.H., 1979. *The Storage of Recalcitrant Seeds: Achievements and Possible Approaches*. Rome: International Board for Plant Genetic Resources. Pp. 96.
- Krasny M.E., Vogt K.A., Zasada J.C., 1988. Establishment of four Salicaceae species on river bars in interior Alaska. *Holarctic Ecology* 11: 210B219.
- E.N.S.E. Tavazzano, Laboratorio Analisi Sementi, (LO), 2008. Scheda tecnica per la valutazione delle plantule.
- Lytle D.A., Poff N.L., 2004. Adaptation to natural flow regimes. *Trends in Ecology and Evolution*, 19: 94–100.
- Maisenhelder L.C., 1951. Planting and growing cottonwood on bottomlands. Bull. 485. Mississippi Agricultural Experiment Station. 23 p.
- Masubelele N. H., Dewitte W., Menges M., Maughan S., Collins C., Huntley R., Nieuwland J., Scofield S., and Murray J. A. H., 2005. D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:15694–9.
- McDonough W.T., 1979. Quaking aspen: seed germination and early seedling growth. Res. Pap. INT-234. Ogden UT: USDA Forest Service. 13 p.
- Millennium Ecosystem Assessment., 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC. Disponibile all'indirizzo <http://www.unep.org/maweb/documents/document.356.aspx.pdf> (ultimo accesso 17 febbraio 2015).
- Morohashi, Y., and Bewley J.D., 1980. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 66, 70-73.
- Morohashi Y., 1986. Patterns of mitochondrial development in reserve tissue of germinated seeds: A survey. *Physiol. Plant.* 66, 653-658.
- Mumford P.M., and Brett A.C., 1982. Conservation of cacao seed. *Trop. Agric (Trinidad)* 59:306-310.
- Ni B. R., and Bradford K. J., 1993. Germination and dormancy of abscisic acid and gibberellin- deficient mutant tomato seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin and water potential. *Plant Physiol.* 101:607–17.
- Niiyama K., 1990. The role of seed dispersal and seedling traits in colonization and coexistence of Salix species in a seasonally flooded habitat. *Ecological Research*, 5: 317–331.
- Pasqua G., Abbate G., Forni C., 2011. *Botanica generale e diversità vegetale*. ATR Acosta-Ed. Piccin.

- Pasquini S., Braidot E., Petrusa E., Vianello A., 2011. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Sci. & Technol.*, 39, 165-177
- Piotto B., Giacanelli V., Ercole S. (A cura di), 2010. La conservazione ex situ della biodiversità delle specie vegetali spontanee e coltivate in Italia. Stato dell'arte, criticità e azioni da compiere. Manuali e linee guida ISPRA 54/2010
- Popivshchy I.I., Prokazin A.E., Routkovsky L.V., 1997. Black poplar in the Russian Federation, In: Turok, J., Lefevre, F., de Vries, S., Toth, B. (Eds.): *Populus nigra* Network. Report of the third meeting, Sarvar, Hungary, 5-7 October 1996, IPGRI, Rome, Italy, pp. 46–52.
- Rao N.K., Hanson J., Dulloo M.E., Ghosh K., Nowell D. and Larinde M., 2006. Manual of seed handling in genebanks. *Handbooks for Genebanks* No. 8. Bioversity International, Rome, Italy
- Roberts E.H., 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1, 499-514.
- Rood S.B., Heinz-Milne S., 1989. Abrupt downstream forest decline following river damming in southern Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 67: 1744–1749.
- Rudolph T.D., 1978. Seed yield and quality in *Populus tremuloides* with gamma-irradiated pollen. *Canadian Journal of Botany* 56: 2967B2972.
- Schmidt L. H., 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre.
- Shafroth P.B., Friedman J.M., Ischinger L.S., 1995. Effects of salinity on establishment of *Populus fremontii* (cottonwood) and *Tamarix ramosissima* (saltcedar) in southwestern United States. *Great Basin Naturalist* 55(1): 58B65.
- Shaykewich C. F., 1973. Proposed methods for measuring swelling pressure of seeds prior to germination. *J. Exp. Bot.* 24:1056–61.
- Simak M., 1980. Germination and storage of *Salix caprea* L. and *Populus tremuloides* L. seeds. In *Proceedings, International Symposium on Forest Tree and Seed Storage*; 1980 Sept. 23B27; Chalk River, ON. Ottawa: Canadian Forestry Service: 142B160.
- Stanton B.J., Villar M., 1996. Controlled reproduction of *Populus*. In: Stettler, R.F., Bradshaw, H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (Eds.): *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp. 113–138.
- Suszka B., and Tylkowski T., 1981. Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1- 5 winters. *Arboretum Kornickie* 25 199-229.
- Tauer C.G., 1979. Seed tree, vacuum, and temperature effects on eastern cottonwood seed viability during extended storage. *Forest Science* 25: 112B114.

Tauer C.G., 1995. Unpublished data. Stillwater: Oklahoma State University, Department of Forestry.

Villiers T.A., 1975. Genetic maintenance of seeds in imbibed storage. Pp. 297-316 in *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow* (O.H. Frankel and J.G. Hawkes, eds.). Cambridge University Press, Cambridge.

Wang B.S.P., 1982. Long-term storage of *Abies*, *Betula*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, and *Populus* seeds. In: *Proceedings, International Symposium on Forest Tree and Seed Storage; 1980 September 23B27; Chalk River, ON.* Ottawa: Canadian Forestry Service: 142B160.

Wyckoff G.W., Harder M.L., 1996. Unpublished data. Grand Rapids, MN: University of Minnesota Aspen & Larch Genetics Cooperative and USDA Forest Service, North Central Experiment Station.

Zasada J.C., Densmore R.A., 1977. Changes in seed viability during storage for selected Alaskan Salicaceae. *Seed Science and Technology* 5: 509B518.

Zasada J.C., Viereck L.A., 1975. Effect of temperature and stratification on germination of Alaska Salicaceae. *Canadian Journal of Forest Research* 5: 333B337.

Zsuffa L., 1974. The genetics of *Populus nigra* L. *Academia scientiarum et artium slavorum meridionalium* (Zagreb). *Annales Forestales*, 6(2): 29–53.

APPENDICE 1

Risultati completi del test di germinazione su substrato cartaceo (tab. 8,9,10,11) e su acqua (tab. 12,13,14,15) suddivisi per laboratorio.

LABORATORIO 1

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	0	0	0
Abnormal Sdlgs	7	2	3	3	3,75
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	2	2	1	2	1,75
Dead Seeds	91	96	96	95	94,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	3	7	6	6	5,5
Abnormal Sdlgs	1	1	5	2	2,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	2	3	3	3	2,75
Dead Seeds	94	89	86	89	89,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 6%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	7	9	7	4	6,75
Abnormal Sdlgs	13	12	6	4	8,75
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	2	2	0	1
Dead Seeds	80	77	85	92	83,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 7%

Tabella 8, Risultati test di germinazioni su substrato cartaceo del Laboratorio 1. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 2

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	2	1	2	1,25
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	2	2	1	3	2
Dead Seeds	98	96	98	95	96,75
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 1%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	16	9	18	9	13
Abnormal Sdlgs	1	3	3	2	2,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	1	1	0	0	0,5
Dead Seeds	82	87	79	89	84,25
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 13%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	16	18	12	16	15,5
Abnormal Sdlgs	2	1	2	1	1,5
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	2	0	2	1	1,25
Dead Seeds	80	81	84	82	81,75
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 16%

Tabella 9, Risultati test di germinazioni su substrato cartaceo del Laboratorio 2. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 3

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	0	0	0
Abnormal Sdlgs	5	5	3	7	5
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	95	95	97	93	95
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	6	6	1	3,25
Abnormal Sdlgs	3	3	3	6	3,75
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	97	91	91	93	93
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 3%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	2	1	5	6	3,5
Abnormal Sdlgs	5	7	8	5	6,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	93	92	87	89	90,25
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 4%

Tabella 10, Risultati test di germinazioni su substrato cartaceo del Laboratorio 3. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 4

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	0	0	0
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	100	100	100	100	100
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	4	5	3	7	4,75
Abnormal Sdlgs	3	5	4	8	5
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	93	90	93	85	90,25
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 5%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	4	6	3	4	4,25
Abnormal Sdlgs	3	14	19	8	11
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	93	80	78	88	84,75
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 4%

Tabella 11. Risultati test di germinazioni su substrato cartaceo del Laboratorio 4. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 1

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	1	0	0	0,25
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	100	99	100	100	99,75
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	7	2	2	5	4
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	93	98	98	95	96
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 4%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	6	8	2	3	4,75
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	94	92	98	97	95,25
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 5%

Tabella 12, Risultati test di germinazioni su acqua del Laboratorio 1. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 2

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	2	1	1	1
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	1	2	1	1
Dead Seeds	100	97	97	98	98
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 1%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	5	2	5	5	4,25
Abnormal Sdlgs	1	0	0	0	0,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	94	98	95	95	95,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 4%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	6	4	6	3	4,75
Abnormal Sdlgs	0	0	0	1	0,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	1	1	2	2	1,5
Dead Seeds	93	95	92	94	93,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 5%

Tabella 13, Risultati test di germinazioni su acqua del Laboratorio 2. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 3

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	1	1	0,5
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	100	100	99	99	99,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 1%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	4	7	7	10	7
Abnormal Sdlgs	2	2	2	4	2,5
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	94	91	91	86	90,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 7%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	5	4	6	6	5,25
Abnormal Sdlgs	3	5	5	4	4,25
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	92	91	89	90	90,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 5%

Tabella 11, Risultati test di germinazioni su acqua del Laboratorio 3. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

LABORATORIO 4

Lotto#1

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	0	0	0
Abnormal Sdlgs	0	0	0	0	0
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	100	100	100	100	100
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#2

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	0	0	0	0	0
Abnormal Sdlgs	2	1	3	0	1,5
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	98	99	97	100	98,5
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 0%

Lotto#3

Subsample	A	B	C	D	Mean
Normal Sdlgs	2	0	2	1	1,25
Abnormal Sdlgs	3	0	4	0	1,75
Hard Seeds	0	0	0	0	0
Empty Seeds	0	0	0	0	0
Dead Seeds	95	100	94	99	97
Total	100	100	100	100	100

Percentuale Germinelli Normali= 1%

Tabella 15. Risultati test di germinazioni su acqua del Laboratorio 4. A, B, C, D= lettere assegnate a ciascuna replica da 100 semi.

Ringraziamenti

Ringrazio la Prof.ssa Buffa per la disponibilità dimostrata e le numerose ore dedicate alla mia tesi. Desidero ringraziare inoltre il Dr. Pasquini per il suo indispensabile aiuto durante il tirocinio formativo e nella stesura del lavoro. Intendo poi ringraziare il CNBF di Peri (Vr) per avermi dato la possibilità di svolgere il tirocinio formativo, e i suoi dipendenti per la disponibilità dimostrata nei miei confronti. Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto la mia famiglia e gli amici di sempre per il sostegno e per essermi stati vicini in ogni momento durante questo mio percorso di studi.