UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA Tuscia

GRUPPO ITALIANO RICERCA ORCHIDEE SPONTANEE

RIBES

Esperienze di Conservazione *delle* Orchidee

a cura di
Sara MAGRINI, Monica FONCK e Laura ZUCCONI

L'ORTO BOTANICO DELL'UNIVERSITÀ DELLA TUSCIA

L'Orto Botanico della Tuscia, inaugurato il 24 marzo 1991, sorge in un'area di particolare pregio ambientale e storico per la presenza della sorgente termale del Bulicame e di reperti storici di epoca etrusca e romana. Dalla sorgente principale l'acqua defluiva, attraverso canalette, in pozze dove anticamente veniva messa a macerare la canapa. Canalette e pozze presenti all'interno dell'area sono state oggi recuperate e trasformate in ruscelli e laghetti che ospitano ecosistemi acquatici. L'Orto si estende su una superficie di circa 6 ha, ad un'altitudine di 300 m s.l.m. Nel sottosuolo, scorrono falde calde ricche di sali minerali, soprattutto carbonati.

Il clima dell'area è caratterizzato da forti escursioni termiche annuali, con temperature che in inverno possono raggiungere diversi gradi sotto lo zero con gelate notturne e sporadiche nevicate; in estate, invece, la temperatura è particolarmente alta, fino a raggiungere talvolta 35°C.

L'Orto Botanico della Tuscia rappresenta un ideale laboratorio all'aperto nel quale sono ospitate oltre 3000 specie vegetali provenienti da tutti i continenti, disposte secondo criteri tassonomici, fitogeografici, o ricostruzioni ambientali, compatibilmente con le caratteristiche climatiche e pedologiche dell'area.

Struttura di supporto alla didattica e ricerca universitaria, qui vengono svolte attività di conservazione della biodiversità, sviluppate attività di documentazione, educazione ambientale e diffusione delle conoscenze scientifiche, organizzate esercitazioni, tirocini, corsi di formazione, mostre tematiche ed eventi.

Sara MAGRINI, Monica FONCK e Laura ZUCCONI
a cura di

Esperienze di Conservazione *delle* Orchidee

Orto Botanico della Tuscia
2014

Pubblicazione realizzata nell'ambito del progetto per la Diffusione della Cultura Scientifica dal titolo "*Conservazione* ex situ *di orchidee spontanee: didattica e divulgazione*", finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Universita e della Ricerca (Progetti annuali (L. 6/2000), PANN12_00474) e grazie al contributo di GIROS - Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee.

A cura di:

Sara MAGRINI, Banca del Germoplasma della Tuscia, Università degli Studi della Tuscia, largo dell'Università, 01100 Viterbo. E-mail: magrini@unitus.it
Monica FONCK, Orto Botanico della Tuscia, Università degli Studi della Tuscia, strada Bullicame, 01100 Viterbo. E-mail: fonck@unitus.it
Laura ZUCCONI, Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università degli Studi della Tuscia, largo dell'Università, 01100 Viterbo. E-mail: zucconi@unitus.it

Autori:

Martino ADAMO, Elisabetta ALOISI MASELLA, Ilaria BONINI, Antonio BORZATTI, Sergio BUONO, Valentina CARASSO, Paolo CASTAGNINI, Roberta M. CERIANI, Giorgio CHIOCCIA, Giampiero CIASCHETTI, Marcello DE VITIS, Luciano DI MARTINO, Enrico ERCOLE, Giuseppe FABRINI, Michael F. FAY, Monica FONCK, Bruno GALLINO, Emanuele GRANSINIGH, Genet HAILE, Iolanda LEGITIMO, Simona MACCHERINI, Sara MAGRINI, Mairo MANNOCCI, Timothy R. MARKS, Viviano MAZZONCINI, Giuseppe PELLEGRINO, Simon PIERCE, Andrea PIRONDINI, Hugh W. PRITCHARD, Bruno QUOCHI, Massimiliano REMPICCI, Enrico SCARICI, Philip T. SEATON, Elisabetta SGARBI, Laura ZUCCONI

Progettazione, impaginazione e realizzazione grafica: Sara Magrini

©2014
Tutti i diritti riservati: Orto Botanico della Tuscia
ISBN: 978-88-909977-0-9

Foto di copertina:
Fronte: *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase in loc. Bagnaccio, Viterbo (foto S. Magrini)
Retro: *Ophrys xgrottagliensis* P. & C. Delforge all'Orto Botanico della Tuscia (Viterbo) (foto M. Rempicci)

Per la citazione di questo volume si raccomanda:

Magrini S., Fonck M., Zucconi L. (a cura di), 2014. Esperienze di conservazione delle orchidee. Orto Botanico della Tuscia. Tipolitografia Quatrini, Viterbo. 112 pp.

PRESENTAZIONE

Presentando al GIROS l'anno scorso le varie iniziative in preparazione per il 2014, anno nel quale celebriamo il primo ventennale di vita della nostra Associazione, riflettevo sul fatto che l'importanza delle nostre attività rivolte alla tutela delle orchidee spontanee può forse apparire un po' subordinata rispetto alle nostre attività di ricerca, termine questo che figura in posizione centrale a partire dal nome stesso del GIROS.

Eppure la protezione e conservazione delle orchidee è uno dei nostri scopi statutali fondamentali: non solo ovviamente perché la ricerca e lo studio di queste meravigliose piante possono dare risultati gratificanti per i nostri appassionati solo se la loro presenza nei vari territori è soddisfacente, ma soprattutto per il loro alto significato ecologico. Un habitat ricco di orchidee è sicuramente un ambiente che gode ottimo stato di salute, soprattutto dal punto di vista della biodiversità.

La conservazione in situ*, cioè la protezione degli habitat naturali e seminaturali, è un obbiettivo che si può dire sia sempre stato ben presente ai nostri appassionati e ai naturalisti in genere; un po' più estraneo alla nostra mentalità è il passo successivo, la conservazione* ex situ*. La protezione degli habitat non è infatti sempre sufficiente a proteggere le popolazioni di orchidee presenti: alcuni habitat - anche in assenza di solitamente dannosi interventi umani - sono comunque soggetti "naturalmente" a rapida evoluzione con riduzione e possibile scomparsa delle orchidee e di altre piante rare. Le tecniche di riproduzione da seme delle piantine di orchidee - ritenute impraticabili fino a pochi decenni fa, soprattutto per le note difficoltà legate alla presenza dei funghi simbionti - hanno conosciuto negli ultimi tempi una grande e positiva evoluzione.*

Questa pubblicazione fa il punto sullo stato dell'arte e sulle prospettive, con l'aiuto di tanti studiosi italiani e stranieri che hanno messo a punto le varie esperienze; colgo l'occasione per ringraziare i nostri soci che hanno collaborato, in particolare la Sezione GIROS "Etruria meridionale", che da anni è parte attiva con l'aiuto sul campo al progetto coordinato dall'Università della Tuscia (Orto Botanico e Banca del Germoplasma).

Ben volentieri abbiamo dato il nostro patrocinio e un contributo economico per la realizzazione di questo libro, considerandolo a ragione un'altra importante occasione di celebrazione del nostro Ventennale.

Mauro Biagioli
Presidente di GIROS- Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee

PRESENTAZIONE

Per Guy de Maupassant le orchidee erano «esseri prodigiosi, inverosimili, figlie della terra sacra, dell'aria impalpabile e della calda luce». Certamente le orchidee sono tra i fiori che hanno maggiormente ispirato la fervida fantasia di scrittori e artisti di ogni tempo così come la loro coltivazione viene comunemente considerata un'arte difficile e misteriosa, riservata a chi può permettersi di astrarsi dalla vita quotidiana per dedicare parte del proprio tempo a riti espressi rigorosamente con tecniche complesse, riservate ai soli adepti. Fonte ispiratrice di tali riflessioni sono, per lo più, le orchidee esotiche, tropicali, soprattutto quelle con fiori grandi, variopinti e straordinariamente "plastici". Meno note al grande pubblico sono le orchidee spontanee. Eppure le "nostre" orchidee, quelle che crescono nelle garighe, nelle radure erbose, nei pascoli alpini, torbiere o foreste, racchiudono gli stessi misteri delle loro sorelle straniere. Anzi si può senz'altro dire che le tecniche per coltivare alcuni generi esotici si sono affermate e standardizzate a livello industriale, perdendo un po' del mistero che le avvolgeva, mentre quelle per moltiplicare, riprodurre e far crescere le orchidee spontanee dei nostri paesi restano ancora difficili e riservate all'ambito della sperimentazione.

È proprio nel mondo della ricerca che è nato questo volume: uno scambio di esperienze, una volontà di condividere conoscenze maturate sul campo, nei laboratori, nelle banche del germoplasma, tra esperti di diverse discipline che hanno sviluppato le loro attività indagando su aspetti specifici: il rapporto tra orchidee e funghi, l'impollinazione, la conservazione ex situ *e* in situ *ecc. Esistono diversi e validi motivi per approfondire e svolgere studi sulle orchidee spontanee. La famiglia delle orchidacee è una tra le più ricche di specie in assoluto; il numero preciso lo leggerete nelle prossime pagine, ma fra queste ve ne sono alcune che meritano la nostra attenzione perché la loro sopravvivenza è a rischio. L'UICN, Unione Internazionale per la Conservazione della Natura, ha considerato finora, nella propria Red List, 515 specie; di queste, 44 sono in Europa e, fra queste, una è gravemente minacciata e dodici minacciate. In Italia venti specie di Orchidacee risultano finora classificate tra le categorie UICN, quattro delle quali sono state valutate nella categoria "minacciate"; tre di queste sono legate alle foreste e una ai pascoli. Il declino di queste piante dipende dalla perdita del loro habitat a causa di attività dell'uomo, quali la costruzione di strade, l'urbanizzazione, il turismo, ma anche l'abbandono delle tradizionali pratiche rurali. Non tutte le orchidee della flora italiana sono state valutate e diverse altre specie sono rare e, purtroppo, minacciate, anche se non risultano ancora ufficialmente tali.*

Queste e altre ragioni spingono a raccogliere e conservare i semi delle orchidacee, ad avviare la riproduzione e, in qualche caso, a rinforzare le popolazioni locali, per contribuire a mantenere la diversità della nostra flora. Anche RIBES, la Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione *Ex-Situ* della flora spontanea italiana*, partecipa - con progetti e attività svolti presso alcuni dei centri che la costituiscono (in particolare la Banca del Germoplasma della Tuscia) - a preservare la diversità delle orchidee italiane ed è quindi con grande piacere che invito alla lettura di questo volume. Sono convinto che possa rappresentare la base scientifica per un percorso tutto da sviluppare con il coinvolgimento non solo dei botanici e dei ricercatori, ma anche di altri soggetti, come gli enti territoriali, a cui è attribuito il compito istituzionale di salvaguardare l'ambiente.*

Mauro Mariotti
Presidente di RIBES- Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione *Ex-Situ* della flora spontanea italiana

INDICE

Orchidee: minacce e conservazione 9
Ruolo dell'impollinazione nella conservazione delle orchidee....13
Micorrize e conservazione delle orchidee....17
Riproduzione *in vitro* e coltivazione....23
Le orchidee a rischio di estinzione in Italia 28
Conservazione *in situ* e rafforzamento di popolazioni di orchidee spontanee....33
Conservazione *ex situ*: esperienze in orti botanici e banche del germoplasma 39
Monitoraggio e azioni sul popolamento di Cypripedium calceolus *nel Parco Nazionale della Majella*....40
Conservazione in situ/ex situ *di orchidee nella Provincia di Livorno.*....42
Le orchidee spontanee della Toscana Centro-Meridionale....46
Conservazione ex-situ *di alcune orchidee spontanee piemontesi presso il Centro Biodiversità Vegetale dell'Ente di Gestione del Parco Naturale del Marguareis* 48
Conservazione ex situ *di orchidee all'Orto Botanico di Roma*....50
Il progetto "CrioBanca del Germoplasma dell'Università di Modena e Reggio Emilia"....52
OSSSU: una rete internazionale per la conservazione dei semi delle orchidee....53
La collezione di orchidee spontanee all'Orto Botanico della Tuscia.... 57
Conservazione delle orchidee nella Banca del Germoplasma della Tuscia....61
Schede dei generi e delle principali specie conservate....65
gen. *Anacamptis* Rich. 66
Anacamptis palustris (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon e M.W. Chase....68
gen. *Barlia* (Biv.) Parl. 70
gen. *Cephalanthera* Rich. 72
gen. *Cypripedium* L. 74
gen. *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski....76
gen. *Epipactis* Zinn....78
Epipactis placentina Bongiorni & Grünanger....80
gen. *Epipogium* Borkh. 82
gen. *Himantoglossum* Spreng. 84
gen. *Limodorum* Boehm. 86
Limodorum trabutianum Batt. 88
gen. *Listera* R. Br. 90
gen. *Neotinea* Rchb.f. 92
gen. *Neottia* Guett. 94
gen. *Ophrys* L. 96
gen. *Orchis* L. 98
gen. *Platanthera* Rich. 100
gen. *Serapias* L. 102
gen. *Spiranthes* Rich. 104
Vademecum per la raccolta dei semi delle orchidee spontanee....106

Orchidee: minacce e conservazione

Michael F. Fay

Chair, Orchid Specialist Group, Species Survival Commission - IUCN
E-mail: m.fay@kew.org

La famiglia *Orchidaceae* è la più abbondante fra le Angiosperme, con stime del numero di specie che va da 20000 a 35000 (Cribb *et al.*, 2003). Le orchidee costituiscono anche uno dei gruppi più carismatici, tanto che dai primi anni '90 si è verificato un incredibile aumento della loro produzione commerciale (come piante in vaso e fiori recisi). Come risultato, le orchidee ora sono popolari e familiari alla maggior parte delle persone in tutto il mondo come piante d'appartemento o fiori per *bouquet*.

Nonostante questo incremento nella popolarità e disponibilità in commercio, molte orchidee sono ancora soggette ad un alto livello di rischio a causa di una serie di fattori. Nella sintesi del piano d'azione per la conservazione delle orchidee dell'IUCN, Pridgeon (IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996), per esempio, ha scritto che per secoli le orchidee hanno catturato l'immaginazione, ispirando raccolte di massa nella seconda metà del XIX secolo che poi si sono concentrate, in tempi recenti, su alcuni generi come *Paphiopedilum*, ma che oggi la minaccia più grande alla loro diversità è la perdita di habitat. Alle minacce evidenziate da Pridgeon, Cribb *et al.* (2003), nella loro introduzione ai *Proceedings of the 1st International Orchid Conservation Congress*, aggiungono i cambiamenti climatici (come riscaldamento globale), parlando anche di disboscamento, cambiamenti di uso del suolo e raccolta eccessiva come le maggiori minacce antropiche per le orchidee spontanee. Queste minacce sono ancora presenti ed è pertanto necessario elaborare stategie di conservazione che le tengano in considerazione.

La necessità di conservare le orchidee ha portato alla realizzazione di una serie di congressi dal tema "*International Orchid Conservation*", il primo tenutosi a Perth, Western Australia, nel 2000 ed il quinto a St Denis, La Réunion, nel 2013. Riunendo esperti conservazionisti da tutto il mondo, questi congressi hanno fornito l'opportunità di imparare dai colleghi e di conoscere i loro approcci per la conservazione *in situ* ed *ex situ* delle orchidee.

Non tutte le orchidee sono soggette allo stesso grado di rischio. L'utilizzo delle *IUCN Red List Categories and Criteria* (IUCN, 2001) è uno dei metodi più oggettivi e coerenti per comparare il livello di rischio di diverse specie o gruppi. Ad oggi, comunque, solo una piccola percentuale delle orchidee è stata valutata a livello globale per la "*IUCN Red List of Threatened Species*" (IUCN, 2013). All'inizio del 2014, solo 515 specie di orchidee (1,5-2,0% della famiglia) sono incluse nella *Red List* globale, contro il 100% di specie di conifere e di piante carnivore valutate e circa il 20% di palme. C'è così tanto lavoro da fare!

Il processo di *red listing* consente di fare valutazioni anche a livello regionale (cioè sub-globale, *sensu* IUCN), così molte orchidee sono state valutate, per esempio, in Europa, Australia, Brasile ed Ecuador, consentendo di comprendere maggiormente il loro grado di rischio rispetto a quello che appare nella *Red List* globale. Che cosa ci dicono i numeri? Globalmente (Fig. 1), la buona notizia è che sono 180, circa il 35%, le specie valutate come "A minor rischio" (LC, *Least Concern*). Comunque, più del 25% delle specie risultano "Minacciate" (EN, *Endangered*) e oltre il 10% sono "Gravemente minacciate" (CR, *Critically Endangered*). A livello regionale, in Europa, le cifre sono un po' meno preoccupanti, con circa

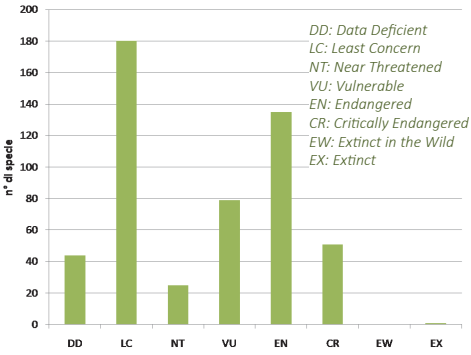


Fig. 1. Categorie di rischio a livello globale per le 515 specie di orchidee nella *IUCN Red List* (inizio 2014)

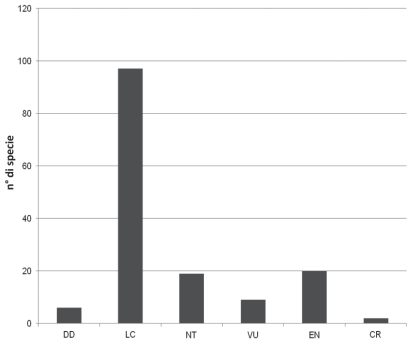


Fig. 2. Categorie di rischio a livello regionale per le 153 specie di orchidee europee nella *IUCN Red List*. Abbreviazioni come in Fig. 1

due terzi delle 155 specie valutate che risultano "A minor rischio" (Fig. 2). Queste includono orchidee come *Orchis militaris* L. e *Orchis simia* Lam., entrambe classificate come "Vulnerabili" (VU, *Vulnerable*) nella "*UK Red List*", evidenziando la possibilità di applicare diverse categorie di rischio in valutazioni effettuate a livelli diversi. Come ulteriore esempio, *Cypripedium calceolus* L. è valutato come "A minor rischio" (LC) in Europa e a livello globale, ma risulta "Gravemente minacciato" (CR) in Gran Bretagna.

Siamo lontani dall'avere valutazioni complete dello stato di conservazione delle orchidee in molte parti del mondo. Comunque, è ovvio come alcuni gruppi tassonomici e alcune regioni siano a maggior rischio rispetto ad altri.

La sottofamiglia *Cypripedioideae* attualmente è oggetto di una valutazione globale da parte dell'*Orchid Specialist Group* della *Species Survival Commission* dell'IUCN e sono state completate le valutazioni per tutte le 52 specie di *Cypripedium* che saranno inserite nella *Global Red List* nel 2014. La cattiva notizia è che queste orchidee mostrano un livello di rischio considerevolente più alto rispetto alle orchidee in generale. Tra le specie di *Cypripedium*, solo 7 sono "A minor rischio" e 4 "Quasi a rischio" (NT, *Near Threatened*) e 28 specie (54%) sono "Minacciate" (EN) o "Gravemente Minacciate" (CR). Prevedibilmente, quelle che risultano *Least Concern* sono specie ad ampia distribuzione, come *C. calceolus* (vedi sopra), che sebbene minacciate in alcune regioni hanno una così ampia distribuzione che attualmente non c'è alcuna minaccia globale alla loro sopravvivenza. *Cypripedium* include molte specie, comunque, che hanno una distribuzione molto più ristretta e queste sono proprio le specie che ricadono nelle categorie di rischio maggiori. Sebbene non ci sia ancora una valutazione completa di tutte le specie di *Paphiopedilum*, la situazione appare essere ancora peggiore che in *Cypripedium*. Le cosiddette "*Slipper orchids*" sono quindi tra le orchidee e gli organismi maggiormente a rischio di estinzione sulla terra (H. Rankou *et al*., inedito). Una minaccia particolare per *Cypripedium* e *Paphiopedilum* e per altri gruppi appariscenti e attraenti dal punto di vista orticulturale è la raccolta indiscriminata di specie rare, anche quando gli habitat in cui si trovano non sono a rischio. Tale comportamento, basato sull'avidità, non dovrebbe essere tollerato. Anche altri gruppi sono minacciati dal sovra-sfruttamento, non per il collezionismo come per le "*Slipper orchids*", ma per il consumo, per esempio come "*salep*" nel Mediterraneo e nel medio Oriente o come "*chikanda*" in Zambia e Tanzania, o anche per la medicina tradizionale in Asia. Lavorare per definire protocolli per l'uso sostenibile delle orchidee spontanee deve essere quindi un'alta priorità, come sancito nella Convenzione sulla Diversità Biologica, per proteggere queste specie proteggendo allo stesso tempo le condizioni di vita delle persone che dipendono da queste risorse naturali.

Le foreste tropicali sono uno degli esempi più estremi di habitat minacciato, essendo contemporaneamente sia fra gli habitat più ricchi di biodiversità che sottoposti ad enormi pressioni a causa del disboscamento e la deforestazione (vedi esempi in Cribb *et al*., 2003). Di conseguenza, le orchidee tropicali sono quasi certamente più a rischio rispetto alle orchidee terrestri europee. Avendo complessi cicli vitali, che notoriamente includono simbiosi micorriziche e diverse strategie di impollinazione, per la conservazione delle orchidee si deve necessariamente tenere in considerazione anche la conservazione degli altri organismi coinvolti. Il metodo più efficace per conservare le orchidee è quindi conservare l'ecosistema in cui vivono e ci sono numerose iniziative nel mondo in cui individui, organizzazioni non-governative e governi stanno cercando di proteggere parti di territorio così che le orchidee e gli altri organismi abbiano delle possibilità di sopravvivenza per il futuro.

La "*Orchid Conservation Alliance*", per esempio, è focalizzata sulla protezione degli habitat come miglior approccio per la conservazione delle orchidee. Come affermato nel loro sito web "*La Orchid Conservation Alliance è stata fondata nel 2006 per promuovere la conservazione delle orchidee e dei loro habitat in tutto il mondo. Proteggere gli habitat naturali delle orchidee preserva le orchidee, i loro impollinatori, la loro diversità genetica e gli uccelli, rane, insetti, rettili e mammiferi nelle foreste dove vivono*" (http://www.orchidconservationalliance.org).

Un'altra recente azione degna di nota è la dichiarazione, con Decreto Presidenziale nel 2013, dell'Ecuador come "*Country of Orchids*", con connesse disposizioni per la protezione degli habitat delle orchidee e la promozione di ecoturismo, ecc.

Molti relatori al recente "*5th International Orchid Conservation Congress*" hanno parlato di aree protette in diversi Paesi e ci sono molte attività relative alla conservazione degli habitat in tutto il mondo, ma è necessario che ce ne siano di più.

A fronte dei cambiamenti climatici, comunque, la conservazione *in situ* non può essere la sola soluzione. Le specie che vivono in ambienti estremi, sulla cima delle montagne o sulle isole, per esempio, possono avere bisogno di ulteriore sostegno, c'è quindi la forte possibilità che la conservazione *ex situ* in banche del germoplasma e orti botanici possa giocare un ruolo essenziale nei progetti per la conservazione di tali specie.

Oggi conosciamo le orchidee come mai prima, ne conosciamo la distribuzione, le interazioni biologiche e le minacce alla loro sopravvivenza, ma di fronte alla perdita di habitat, ai cambiamenti climatici e al sovrasfruttamento indiscriminato non possiamo permetterci di essere compiacenti. Dobbiamo continuare a proteggere aree più ampie possibile con habitat intatti e a portare avanti ricerche sulle orchidee e sulla loro conservazione, usando le conoscenze sulla loro biologia per dare informazioni gestionali per la loro conservazione. Non farlo porterebbe ad un mondo con una diversità sempre di orchidee più ridotta per le generazioni future.

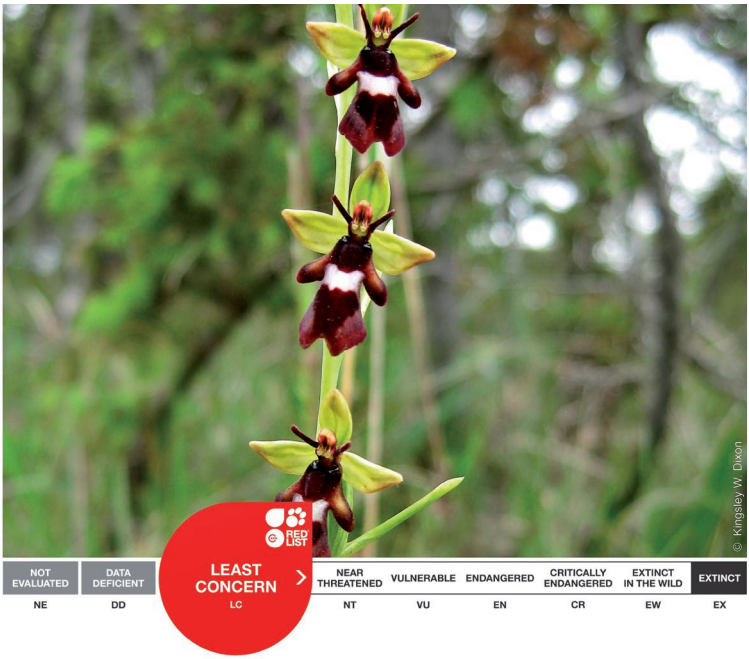
BIBLIOGRAFIA

Cribb P.J., Kell S.P., Dixon K.W., Barrett R.L., 2003. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon K.W., Kell S.P., Barrett R.L., Cribb P.J. (eds.), Orchid conservation: 1-24. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Sabah).

IUCN, 2001. IUCN Red List Categories and Criteria. Version 3.1. www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria

IUCN, 2013. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org

IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 1996. Orchids - status survey and conservation action plan. Gland & Cambridge: IUCN.



Geographical range

www.iucnredlist.org
OrchidSpecialistGroup
Help Save Species
www.arkive.org

Amazing Species: Fly Orchid

The **Fly Orchid**, *Ophrys insectifera*, is listed as 'Least Concern' on the IUCN Red List of Threatened Species™. It is mainly a Central European species, but it occurs from Ireland to the Ukraine and from central Scandinavia to northern Spain.

The *Ophrys* group are a wonderful example of how orchid flowers can imitate insects in order to ensure pollination. Not only have they evolved to look like an insect, but they mimic sexual pheromones to attract the male of the species which pollinate the flowers as they attempt to mate with them. Predominantly favouring open woodlands, some populations of the Fly Orchid can be found in more open habitats. Although widespread, this species is declining in many countries; threats include clearance of woodlands, changes in forest management, draining and agricultural modification.

Currently, the main conservation measure for this orchid is habitat protection, but more specific and targeted protection will be required if population sizes decline further. Since the Fly Orchid relies on the sexual deception of digger wasps for its pollination, effective conservation will also be assisted by a biological understanding of the complex interaction between the two species.

The production of the IUCN Red List of Threatened Species™ is made possible through the IUCN Red List Partnership.

Amazing Species è un'iniziativa dell'IUCN per la diffusione delle conoscenze sulle specie a rischio: *Ophrys insectifera* L. è l'unica orchidea pubblicata finora sul sito web: www.iucnredlist.org

Ruolo dell'impollinazione nella conservazione delle orchidee

Giuseppe Pellegrino

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra, Università della Calabria.
E-mail: giuseppe.pellegrino@unical.it

Le orchidee sono note per la loro elevata variabilità morfologica, il cui valore tassonomico è di cruciale importanza per la loro tutela. Dal punto di vista della conservazione, infatti, è fondamentale comprendere se a tale polimorfismo corrispondano specie differenti o se esso rientri nella variabilità intraspecifica dovuta alle condizioni ecologiche locali. Ma per capire a pieno i processi che sono alla base di tali variazioni morfologiche bisogna prestare grande attenzione allo stretto legame che si è instaurato tra orchidee ed insetti impollinatori. Una profonda conoscenza della biologia della riproduzione può contribuire infatti a chiarire quale sia il valore evolutivo di tale polimorfismo e se sia dovuto a deriva genetica o se sia generato da selezione naturale e adattamento locale, fattori che meritano considerazione in una corretta politica di tutela e conservazione.

L'evoluzione della riproduzione sessuale è sicuramente una tappa importante per la vita delle piante sulla terra. I livelli di ricombinazione e diversità genetica sono strettamente legati ai meccanismi di riproduzione, infatti se l'assenza di ricombinazione si verifica, ad esempio, nei casi di specie agamospermiche (nelle quali l'embrione ha esclusiva origine materna), i livelli più alti, invece, si raggiungono nelle specie dioiche, nelle quali l'incrocio tra individui differenti è obbligatorio, poichè la specie presenta individui con fiori maschili separati dagli individui con fiori femminili. I due estremi, agamospermia e dioicia, sono piuttosto rari nelle orchidee, il primo perchè in esse per la completa formazione del gametofito femminile è necessario lo stimolo della presenza del polline sullo stigma, il secondo perchè ogni singolo individuo delle orchidee ha sempre fiori ermafroditi. In piante monoiche e autocompatibili

Fig. 1. Farfalla (*Aporia crataegi* Linnaeus, 1758) su *Gymndenia conopsea* (L.) R.Br. (foto M. Duvernay)

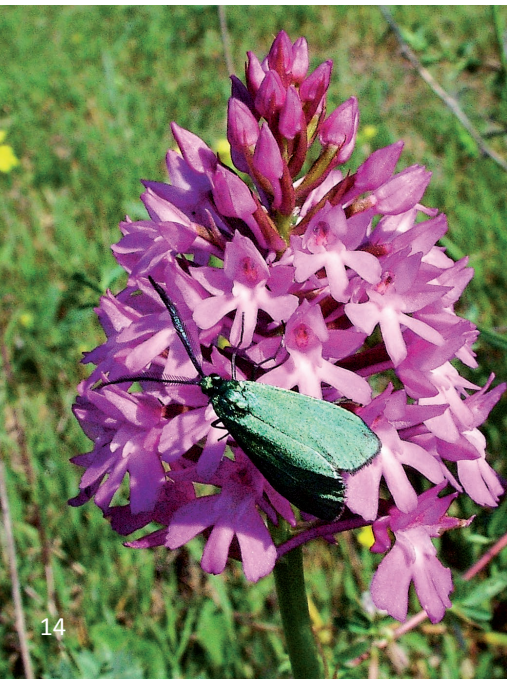
come le orchidee si sono evolute modificazioni delle strutture fiorali che tendono ad aumentare i livelli di incrocio intraspecifico, creando, nel contempo, barriere al flusso genico interspecifico.

Tali meccanismi sono strettamente legati alla grande diversità di strategie di impollinazione messe in atto dalle orchidee e per le quali sono largamente note. Basti pensare che per ciò che concerne l'interazione pianta-insetto non si può parlare di coevoluzione ma piuttosto di modificazioni unilaterali da parte dell'orchidea senza alcun cambiamento da parte degli impollinatori (Williams, 1982), in considerazione anche del fatto che le orchidee sono comparse sulla terra quando gli insetti avevano già evoluto e stabilito complessi mutualismi con altre Angiosperme (Dilcher, 2000).

Le orchidee che offrono ricompensa alimentare (Fig. 1), come nettare, olii o fragranze, mostrano la tendenza a ridurre il numero di specie di impollinatori con conseguente incremento della specializzazione del sistema di impollinazione (Johnson & Steiner, 2000). Questo aumento della fedeltà agli impollinatori da un lato riduce la perdita di polline, ma, al contempo, diminuisce il numero di visite (Tremblay, 1992). Nonostante l'apparente efficienza di tale relazione, il successo riproduttivo delle orchidee nettarifere è limitato dalla disponibilità degli impollinatori (Smithson, 2006). Inoltre, maggiore è la specificità per gli insetti impollinatori maggiore è il rischio di estinzione dell'orchidea se ci dovesse essere una diminuzione o perdita completa dell'impollinatore, con drammatiche conseguenze per la conservazione della specie (Wilcock & Neiland, 2002).

Più di un terzo delle orchidee non sono nettarifere ed hanno quindi evoluto strategie ingannevoli per garantirsi le visite degli insetti. I principali meccanismi di inganno sono la "*food deception*" o "*inganno alimentare*" con mimicria fiorale (Fig. 2), l'offerta di riparo, tana o nido (Fig. 3) e l' "*attrazione sessuale*" (Fig. 4). Nell'inganno alimentare le orchidee non nettarifere somigliano morfologicamente ad altre dotate di nettare, confondendo l'insetto che è spinto a visitare l'una e l'altra pianta (Fig. 2). Nel secondo caso i pezzi fiorali assumono una forma a tubo (tipico caso nel genere *Serapias*) che gli insetti utilizzano quale riparo o rifugio, prelevando in tal modo i pollinii e garantendone il trasporto. Infine l'inganno sessuale implica che il labello di alcune orchidee (ad esempio quelle del genere *Ophrys*) assomigli al dorso delle femmine degli insetti impollinatori (Fig. 4) che, attirati anche dagli odori emessi dal fiore stesso e ingannati in un tentativo di copulazione, effettuano invece l'impollinazione della pianta (Jersáková *et al*., 2006).

Fig. 2. Lepidottero (*Jordanita sp.*) *su Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. (foto S. Buono)



Queste strategie di impollinazione hanno un ruolo importante per la sopravvivenza delle specie per vari motivi. Innanzitutto il successo riproduttivo aumenta, sia in termini di numero di frutti, sia di semi prodotti, perchè l'orchidea può investire l'energia non utilizzata nella produzione del nettare, nella formazione dei semi (Tremblay *et al*., 2005); inoltre perchè si hanno livelli maggiori di impollinazione incrociata, diminuendo l'autogamia e la geitonogamia, rispetto alle orchidee nettarifere (Johnson & Nilsson, 1999), e aumentando di conseguenza il flusso genico intraspecifico.

La probabilità che avvenga l'impollinazione, con il conseguente successo riproduttivo, è influenzata da numerosi fattori, quali la perdita del polline nel tragitto tra l'antera di un fiore e lo stigma di un altro, lo scarso numero di impollinatori, l'insufficiente quantità e/o qualità del polline, la presenza sullo stigma di polline eterospecifico. Anche se l'impollinazione in senso

stretto è semplicemente il trasferimento del polline da un fiore ad un altro, essa influenza anche le fasi successive che precedono la formazione dei semi, cioè la formazione del tubetto pollinico e la fertilizzazione. Da ciò si deduce che l'identificazione e la conoscenza dei fattori intrinseci ed estrinseci che possono far diminuire l'efficienza dell'impollinazione, creando un effetto a collo di bottiglia (*bottleneck*) sono fondamentali per la creazione di corrette ed efficaci politiche di conservazione.

A questi fattori naturali bisogna aggiungere anche le attività umane, come l'alterazione dell'ambiente e l'eccessiva raccolta, che influiscono anche sull'impollinazione. Ad esempio, l'eccessiva raccolta comporta una riduzione delle dimensioni di una popolazione con conseguente diminuzione del trasferimento del polline e decremento del successo riproduttivo. L'alterazione degli habitat può avere effetti ancora più drammatici e drastici sulla conservazione delle orchidee. Si possono, infatti, creare condizioni di totale distruzione degli ambienti naturali, con rapida scomparsa delle piante o frammentazione degli habitat, tali da provocare una alterazione nel comportamento, e quindi nelle visite degli impollinatori che vengono limitati dai lunghi e tortuosi percorsi, dovendo superare barriere fisiche costruite dall'uomo (quali strade, fabbricati, ecc.) per poter raggiungere, per esempio, due popolazioni, un tempo uniche ed ora separate (Harris & Johnson, 2004). Pertanto l'alterazione degli ambienti naturali provocata dall'uomo non solo ha effetti diretti sulle orchidee (diminuzione del numero di piante) ma anche sulla comunità entomologica, con ulteriore ricaduta sulle orchidee (diminuzione numero di visite degli insetti).

Fig. 3. Bombo su *Epipactis atrorubens* Hoffm. (foto S. Buono)

Strategia di impollinazione	Descrizione	Numero di generi	Esempi di generi
Ricompensa alimentare	I fiori offrono nettare agli insetti impollinatori	22	*Gymnadenia*
Inganno alimentare (generalista)	I fiori delle orchidee non nettarifere somigliano in forma, colore, odore a quelli di piante nettarifere	38	*Anacamptis, Dactylorhiza, Orchis*
Mimicria fiorale (batesiana)	I fiori delle orchidee non nettarifere somigliano a quelli di una specifica specie di pianta nettarifera	9	*Disa, Orchis*
Imitazione nido	Il fiore simula il luogo di ovodeposizione degli insetti	11	*Epipactis*
Imitazione tana	Il fiore assume forma tubulare imitando un riparo	1	*Serapias*
Pseudoantagonismo	I fiori, vibrando all'aria, vengono "attaccati" dagli insetti	2	*Tolumnia*
Attrazione sessuale	Il labello dell'orchidea somiglia in forma, colore e odore alla femmina di un insetto	22	*Disa, Ophrys*

Fig. 4. Ape (*Andrena flavipes* Panzer, 1799) su *Ophrys fusca* Link subsp. *funerea* (Viv.) Arcang. (foto M. Rempicci)

C'è ancora molto da imparare sulla biologia dell'impollinazione delle orchidee; è chiaro che la relazione orchidea-insetto è più unilaterale che bilaterale, con le orchidee che, per la loro sopravvivenza, fanno molto più affidamento sugli impollinatori di quanto non facciano gli insetti sulle orchidee. Ne consegue che, per tutelare e conservare le orchidee sia necessario un completo approccio su base ecologica-funzionale, in quanto non solo è necessario preservare le orchidee ma anche i loro impollinatori, con le loro fonti di nutrimento, le loro aree di riposo e di rifugio, le loro aree riproduttive, ecc. La conservazione delle orchidee, dunque, non può prescindere dalla conservazione degli habitat e una corretta programmazione dovrebbe perseguire lo scopo di mantenere la biodiversità e l'eterogeneità degli ambienti in modo da permettere alle orchidee una crescita e uno sviluppo nelle condizioni ottimali.

BIBLIOGRAFIA

Dilcher D., 2000. Towards a new synthesis : major evolutionary trends in the angiosperm fossil record. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 7030-7036.

Harris L.F., Johnson S.D., 2004. The consequences of habitat fragmentation for plant pollinator mutualisms. International Journal of Tropical Insect Science 24: 29-43.

Jersáková J., Johnson S.D., Kindlmann P., 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. Biological Review 81: 219-235.

Johnson S.D., Nilsson L.A., 1999. Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination system in orchids. Ecology 80: 2607-2619.

Johnson S.D., Steiner K.E., 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. Trends in Ecology & Evolution 15(4): 140-143.

Smithson A., 2006. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. New Phytologist 169: 419-430.

Tremblay R.L., 1992. Trends in the pollination ecology of the *Orchidaceae*: evolution and systematics. Canadian Journal of Botany 70: 642-650.

Tremblay, R. L., J. D. Ackerman, J. K. Zimmerman, and R. Calvo. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences:a spasmodic journey to diversification. The Biological Journal of the Linnean Society 84:1-54.

Wilcock C.C., Neiland R.M., 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. Trends in Plant Science 7: 270-277.

Williams N.H., 1982. The biology of orchids and euglossine bees. In: Arditti J. (ed.), Orchid Biology. Reviews and Perspectives. II: 119-171. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Micorrize e conservazione delle orchidee

Enrico Ercole

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino.
E-mail: e.ercole@unito.it

A seguito dell'impollinazione, migliaia di semi vengono rilasciati, ciascuno contenente un embrione rudimentale, quasi incapace di svilupparsi perché praticamente privo di sostanze nutritive di riserva. Tuttavia, a partire dallo stesso Darwin, per lungo tempo vennero sollevati molti interrogativi circa i meccanismi legati alla riproduzione delle orchidee, in particolare per quanto riguarda la propagazione e lo sviluppo dei semi. Darwin stimò infatti che se tutti i semi vitali prodotti da una sola pianta di orchidea si fossero sviluppati, avrebbero ricoperto l'intera superficie terrestre nel giro di tre generazioni. Venne quindi riconosciuta l'esistenza di un altro importante fattore limitante al di fuori dell'interazione con gli insetti impollinatori. Darwin stesso scrisse: "*Quello che controlla la moltiplicazione illimitata delle orchidee, è un qualcosa che non può essere raccontato*" (Darwin, 1862).

È con Noël Bernard che si iniziò a far luce sui meccanismi di limitazione della germinazione (Bernard, 1902); con i suoi primi esperimenti, condotti agli inizi del '900, egli documentò la particolare relazione delle orchidee con i funghi simbionti (Fig. 1). La sua intuizione scaturì dalla casuale osservazione di uno scapo fiorale maturo di *Neottia nidus-avis* (L.) Rich. parzialmente sepolto nel suolo, dal quale si osservarono semi colonizzati da funghi, semi germinati e piccoli corpi tuberoidi. Una vera e propria finestra "svelata" sullo sconosciuto mondo sotterraneo delle orchidee.

Si dimostrò quindi che la riproduzione nelle *Orchidaceae* non è solo controllata dagli insetti impollinatori (riproduzione sessuale), ma anche dall'instaurarsi di una associazione micorrizica con i funghi del suolo che consente la germinazione dei semi e lo sviluppo della pianta (Fig. 2).

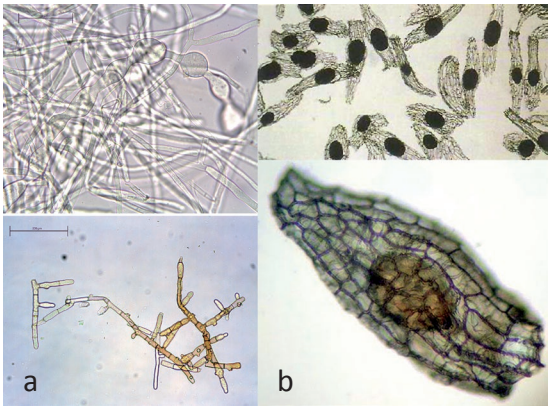


Fig. 1. I partner della simbiosi: a) funghi simbionti di orchidee e b) semi scobiformi (foto E. Ercole)

Le simbiosi micorriziche (*mykorhiza*; dal greco *mykos*: fungo, e *rhiza*: radice) si definiscono come l'interazione strutturale e funzionale del micelio di un fungo con la radice di una pianta. Le micorrize vengono anche considerate come associazioni simbiotiche mutualistiche prodotte dalle interazioni tra i funghi del suolo e la maggior parte delle piante terrestri (circa il 90%).

I funghi micorrizici sono un

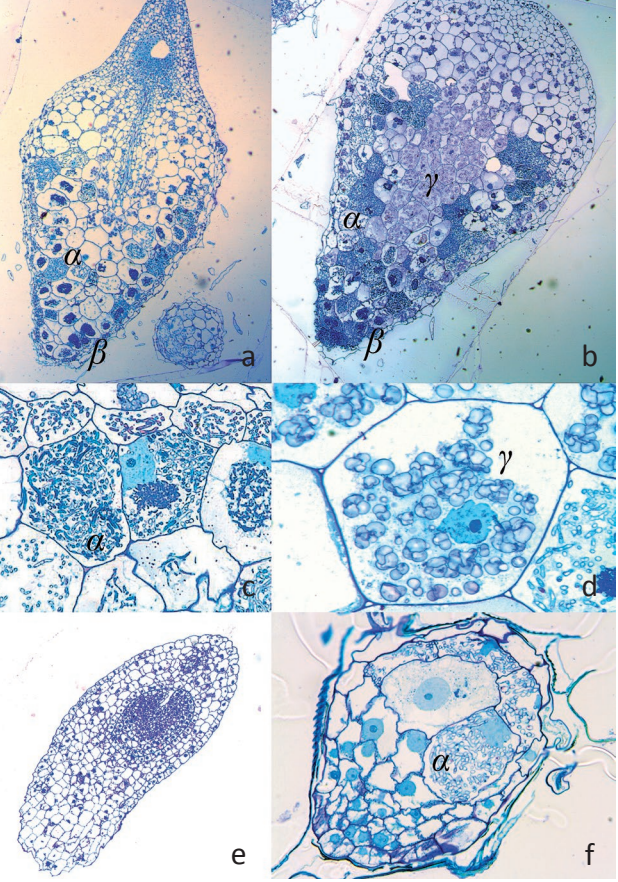


Fig. 2. Sezioni semifini di semi e protocormi in germinazione simbiotica (*Serapias vomeracea* (Burm. f.) Briq. con *Tulasnella calospora*). a) Sezione longitudinale (10x) di protocormo in stadio 3. b) Sezione longitudinale (10x) di protocormo allo stadio 2. c) Sezione trasversale (40x) di protocormo micorrizato, con cellule colonizzate da gomitoli fungini. d) Sezione trasversale (60x) di una cellula amilifera. e) Seme di orchidea allo stadio 0. f) Prima fase di colonizzazione fungina di un seme imbibito allo stadio 1. α) Gomitoli fungini. β) Gomitoli fungini collassati. γ) Granuli di amido. (foto M. Rodda)

gruppo assai eterogeneo da un punto di vista evolutivo e sistematico, in quanto appartengono a diversi *Phyla* del regno *Fungi* (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*). Nonostante questa impressionante diversità genetica, essi sono accomunati dal fatto di instaurare relazioni simbiotiche con le piante, assistendole nella nutrizione minerale (biofertilizzatori), difendendole dagli stress biotici e abiotici (bioprotettori) e ricevendone in cambio zuccheri.

I funghi micorrizici si suddividono poi in due grosse categorie in base al meccanismo di simbiosi instaurato: funghi ectomicorrizici (rimangono all'esterno della radice modificandone la morfologia, micoclene) e funghi endomicorrizici (entrano dentro le cellule della radice). Un esempio di funghi ectomicorrizici sono i macromiceti dei generi *Boletus*, *Amanita* (*Basidiomycota*) e *Tuber* (*Ascomycota*), i quali instaurano simbiosi con specie arboree durante una fase del loro ciclo vitale (produzione dei corpi fruttiferi, carpofori). Tra i funghi endomicorrizici, i più diffusi sono i membri del *Phylum Glomeromycota* responsabili in modo esclusivo delle Micorrize Arbuscolari (AM); questo tipo di micorrize è di fondamentale importanza nei terreni coltivati, nelle praterie e nei deserti.

Nel regno vegetale, le *Orchidaceae* costituiscono una famiglia piuttosto insolita in quanto tutte le specie passano attraverso uno stadio obbligato di dipendenza fungina nel corso dello sviluppo (Rasmussen, 1995); in esse, infatti, la germinazione dei semi in natura è totalmente dipendente per le fonti energetiche e nutrizionali dai partner fungini. Questa forte dipendenza è legata alla morfologia, anatomia e fisiologia dei semi (Fig. 1b). Le *Orchidaceae* infatti producono semi microscopici (scobiformi), consistenti in un piccolo embrione rudimentale senza endosperma, avvolto in un sottile tegumento (testa), generalmente con una lieve polarizzazione strutturale. Da un lato questa particolare fisionomia dei semi porta a un vincolo di associazione micorrizica, ma dall'altro ne permette una facile dispersione anemocora e, grazie all'elevato numero di semi prodotti per capsula, un elevato potenziale dispersivo.

La germinazione simbiotica si avvia attraverso la semplice presenza dell'acqua, che consente l'imbibizione dell'embrione e la conseguente espansione per la rottura dei tegumenti. In seguito alla presenza di un fungo compatibile e alla successiva infezione e penetrazione del micelio attraverso le cellule basali del sospensore dell'embrione, i semi si sviluppano in un

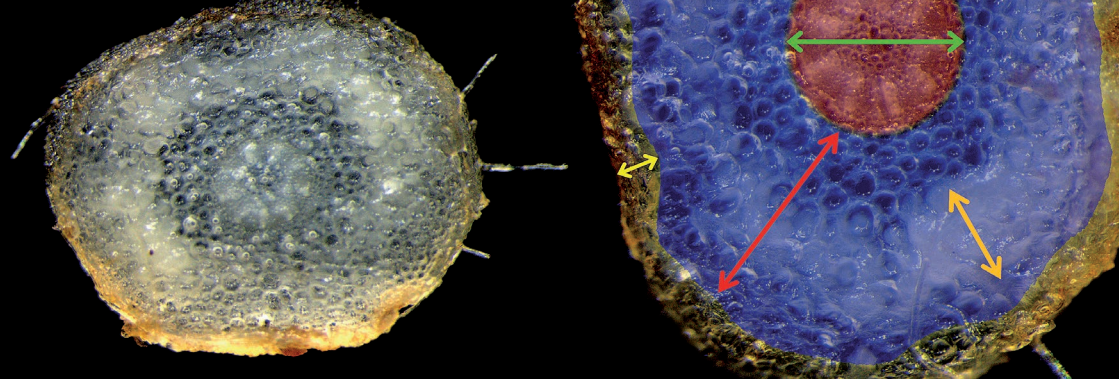


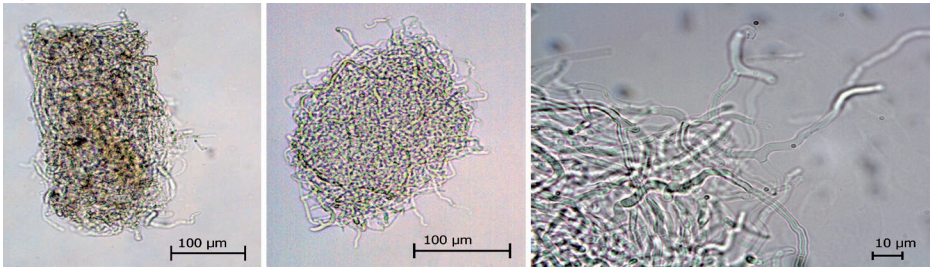
Fig. 3. Sezioni trasversali di radice di *Orchis purpurea* Huds. a fresco (10x). A destra sono schematizzati lo strato epidermidico con peli radicali (freccia gialla), il parenchima corticale (area blu, freccia rossa), uno strato di cellule corticali intensamente micorrizate (area blu, freccia arancio) e il cilindro centrale racchiuso dall'endodermide, barriera per la colonizzazione fungina (area rossa, freccia verde) (foto E. Ercole)

piccolissimo corpo tuberoide detto protocormo (Fig. 2), il quale rappresenta il precursore della pianta adulta. Nella zona equatoriale del protocormo si sviluppano numerose radichette definite rizine, mentre nella parte apicale, a partire da un'estroflessione conica, si originano dapprima il germoglio vegetativo e successivamente le radici. Le nuove radici possono poi essere micorrizate. Il protocormo è aclorofillico ed eterotrofo in quanto, non effettuando fotosintesi, necessita di un apporto nutrizionale esterno (nutrienti minerali e carbonio organico) derivante dai funghi simbionti. Questa dipendenza fungina viene definita micoeterotrofia. Lo stadio micoeterotrofico è obbligato nelle fasi di sviluppo iniziale, ma poi il grado di micoeterotrofia può variare nello stadio adulto e nelle varie specie di orchidee. Con lo sviluppo delle prime foglioline e la loro emersione in superficie, inizia lo stadio fotosintetico della pianta (fatta eccezione per le specie aclorofilliche), con la conseguente maturazione.

All'interno delle singole cellule, sia embrionali, del protocormo, sia del parenchima corticale delle radici (Fig. 2 e 3), le ife fungine formano gomitoli ifali definiti "*pelotons*" (Fig. 4). Questa è la caratteristica tipica della simbiosi endomicorrizica, nella quale la crescita delle ife viene sempre seguita da invaginazioni della membrana plasmatica che separa fisicamente i due organismi. Tutti gli scambi nutrizionali tra pianta e fungo avvengono a livello di membrane cellulari.

Nella maggior parte delle orchidee, i principali funghi simbionti sono specie appartenenti al gruppo eterogeneo e polifiletico delle *Rhizoctonia sensu lato* (genere anamorfo; Roberts, 1999). Questo raggruppamento fungino si deve in quanto tutte le specie presentano determinati caratteri morfologici comuni (Fig. 5) e sono sterili in coltura in vitro. Dalle analisi molecolari del DNA si evince che in questo gruppo formale rientrano specie dei generi *Tulasnella*, *Ceratobasidium* e *Sebacina* (generi telomorfi), funghi normalmente saprotrofi, ma micorrizici nelle orchidee (Perotto *et al.*, 2014).

Fig. 4: Gomitoli fungini (*pelotons*) di specie appartenenti al gruppo delle *Rhizoctonia* prelevati da radici di *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (foto E. Ercole)



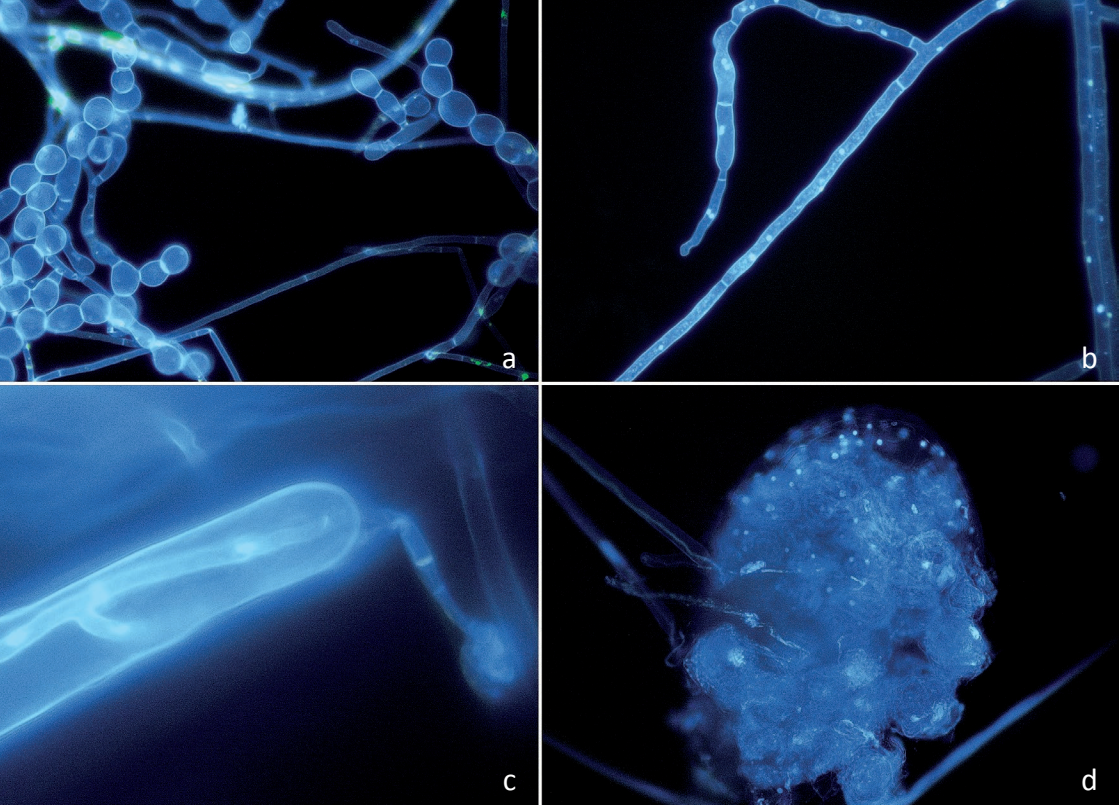


Fig. 5. Immagine al microscopio a fluorescenza con colorazione DAPI di ife di *Tulasnella calospora* isolata da radici micorrizate di *Serapias vomeracea*. a) Cellule moniliodi in catenelle, caratteristica tipica che accomuna le Rhizoctonie, insieme a ife settate, generalmente bi-nucleate, con ramificazioni laterali a 90° e strozzatura alla base della ramificazione (b). c) Ifa penetrante una rizina di protocormo per la colonizzazione interna. d) Protocormo completamente colonizzato; si osservano solo i gomitoli fungini e le ife esterne grazie alla colorazione specifica per il fungo (foto M. Rodda)

In alcune orchidee aclorofilliche (micoeterotrofe anche nello stadio adulto) sono stati riscontrati diversi altri funghi, come ad esempio funghi ectomicorrizici (ECM), funghi decompositori del legno o saprotrofi in generale. Nelle orchidee fotoautotrofe, ma con scarsa efficienza fotosintetica (specie adattate ad ambienti ombrosi, definite come parzialmente fotosintetiche), si riscontrano invece spettri fungini misti, a seconda della specie e dell'ambiente. Recenti studi hanno messo in evidenza che queste specie hanno un trofismo misto; esso varia a seconda del grado di capacità fotosintetica e soddisfa il fabbisogno energetico con l'approvvigionamento di carbonio organico da parte del fungo quando la fotosintesi è inefficiente. Si parla in questo caso di mixotrofia.

I meccanismi per cui le orchidee instaurano simbiosi anche con funghi normalmente saprotrofi e a volte anche con potenziali patogeni, rimangono ancora poco chiari per la scienza, tanto che le orchidee vengono considerate come specie modello di studio. È molto dibattuta anche la visione del grado di mutualismo di queste simbiosi. Dal punto di vista nutrizionale infatti, la simbiosi micorrizica delle orchidee non è poi da considerare completamente mutualistica; si parla di "parassitismo" da parte delle orchidee sui funghi (ad es. nella micoeterotrofia dello stadio adulto), di "tolipofagia" quando le cellule della pianta digeriscono le ife fungine nutrendosene, di "mutualismo variabile" con flussi nutrizionali bi-direzionali (Rasmussen, 1995; Cameron *et al.*, 2008; Stöckel *et al.*, 2013). In alcune specie fotosintetiche, ad esempio, recenti esperimenti indicano che il passaggio ai funghi simbionti di zuccheri provenienti dalla fotosintesi, in realtà non avviene, o avviene in quantità trascurabili.

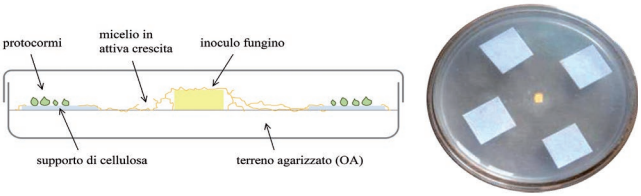


Fig. 6. Schema per la germinazione simbiotica *in vitro* delle orchidee. In capsule Petri contenenti terreno agarizzato a base di avena "oatmeal agar" (OA), i semi vengono posti su supporti a base di cellulosa. Al centro viene inoculato il ceppo fungino, il quale crescendo raggiunge i semi e instaura la germinazione simbiotica (immagine E. Ercole)

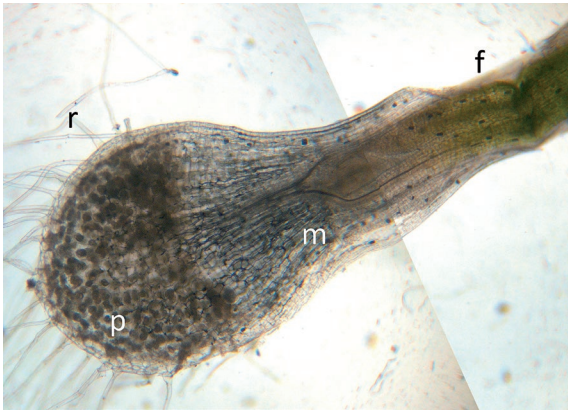
La simbiosi micorrizica nelle orchidee è comunque sempre soggetta a dinamismo. I partner fungini possono cambiare dalla fase di germinazione allo stadio adulto; in molte specie di orchidee si riscontra ad esempio una forte specificità nell'associazione con i funghi micorrizici durante la germinazione (veri e propri fattori limitanti), mentre uno spettro di funghi più ampio nello stadio adulto. Ci possono poi essere anche variazioni dello spettro fungino associato nel corso della vita di una pianta, così come nel corso di una stagione.

Inoltre, il livello di specificità micorrizica può variare a seconda della specie o della distribuzione. Ad esempio, in differenti specie di orchidee simpatriche è stato riscontrato un diverso spettro fungino associato (considerabile come una diversificazione in "nicchie ecologiche"), mentre in specie allopatriche è stata riscontrata una condivisione di spettri fungini (Girlanda *et al*., 2011). Nei casi più estremi si riscontra una stretta specificità tra pianta e fungo che si contrappone a una aspecificità da parte del fungo in quanto capace di associarsi con un'ampia gamma di orchidee (ad es. *Tulasnella calospora*).

Alla luce di quanto fin qui esposto, è evidente il ruolo fondamentale rivestito dalla componente fungina nella diffusione delle orchidee. Questo aspetto risulta quindi di interesse anche sotto il profilo delle tecniche di propagazione e nella conservazione.

In parallelo alla micropropagazione asimbiotica, la micropropagazione simbiotica (detta anche germinazione simbiotica *in vitro*) è uno strumento per la conservazione (e lo studio) delle orchidee, o meglio per la conservazione del "consorzio" simbiotico delle *Orchidaceae* (Fig. 6). La conservazione dei funghi simbionti *in vivo*, diventa quindi di fondamentale importanza, esattamente come quella del germoplasma vegetale. Basti pensare che in natura vi è la totale dipendenza delle orchidee dalle micorrize! La produzione di plantule micorrizate (egualmente efficiente come per quelle da germinazione asimbiotica) rende gli esemplari più idonei alla reintroduzione in natura (Gale *et al*., 2010), dove, già alleati con il partner fungino, sono più competitivi e meno vulnerabili agli stress ambientali (privi nelle colture axeniche *in vitro*). Recenti studi hanno messo in evidenza che la presenza e la distribuzione dei funghi simbionti delle orchidee non è sempre costante,

Fig. 7. Sezione trasversale di una plantula di *Serapias vomeracea* (Burm. fil.) Briq. ottenuta *in vitro*. Si osserva l'intensa micorrizazione nella parte basale del protocormo (p), le rizine (r), la zona meristematica (m) e le foglioline verdi (f). Il fungo simbionte è il ceppo AL13 di *Tulasnella calospora* (foto E. Ercole)



pur trattandosi di specie fungine comunemente diffuse. La loro presenza è infatti spesso correlata a quella delle orchidee (McCormick *et al*., 2012). Per questo motivo diventa necessaria la conservazione dei funghi micorrizici, soprattutto laddove la reintroduzione o la conservazione di popolazioni in sofferenza o in pericolo di estinzione, rende necessaria la reintroduzione o l'inoculo dei funghi alleati. Il concetto di conservazione assume quindi nuove implicazioni; oltre che alla conservazione degli ecosistemi, ci si deve orientare verso azioni integrate di conservazione sia del soprassuolo (conservazione degli insetti impollinatori per garantire la riproduzione sessuale) sia del sottosuolo (conservazione dei funghi simbionti per la germinazione e sviluppo). Si deve tener conto infatti che questa "doppia dipendenza" può acuire il rischio di estinzione nelle orchidee (Waterman & Bidartondo, 2008; Swarts & Dixon, 2009). Ad esempio, molte specie sono rare in quanto, oltre a presentare criticità per gli insetti impollinatori e/o per il loro habitat a rischio, hanno anche un ristretto spettro di funghi simbionti. Ne consegue quindi che l'azione conservativa sia degli insetti impollinatori sia dei funghi micorrizici, risulta essere una prerogativa fondamentale per la conservazione delle orchidee.

La conservazione *ex situ* dei funghi simbionti delle *Orchidaceae*, intesa come il loro isolamento dalle radici e/o dal suolo, non è sempre di facile realizzazione. Tutte queste operazioni necessitano infatti dell'utilizzo di laboratori specializzati, come quelli presenti nelle Micoteche o nelle Università. Grazie poi a recenti tecniche conservative come la criopreservazione (Ercole *et al*., 2013), la vitrificazione o la liofilizzazione, si possono mantenere i funghi in uno stato quiescente che ne preserva in modo soddisfacente il potenziale simbionte rispetto ai ceppi fungini conservati *in vivo* nelle colture axeniche classiche. Questo aspetto riveste una grande importanza perché consente di conservare *ex situ* sia le orchidee che il loro simbionte micorrizico. L'approccio combinato tra strategie *in situ* ed *ex situ* risulta quindi un sistema valido ed efficace nella gestione dei progetti finalizzati alla conservazione.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Bernard N., 1902. Etudes sur la tubérisation. Revue Générale Botanique 14: 1-103.

Cameron D.D., Johnson I., Read D.J., Leake J.R., 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. New Phytologist 180(1): 176-184.

Darwin C., 1862. The Various Contrivances by Which Orchids are Fertilised by Insects. London, UK: John Murray.

Ercole E., Rodda M., Molinatti M., Voyron S., Perotto S., Girlanda M., 2013. Cryopreservation of orchid mycorrhizal fungi: A tool for the conservation of endangered species. Journal of Microbiological Methods 93: 134-137.

Gale S.W., Yamazaki J., Hutchings M.J., Yukawa T., Miyoshi K., 2010. Constraints on establishment in an endangered terrestrial orchid: a comparative study of *in vitro* and *in situ* seed germinability and seedling development in *Nervilia nipponica*. Botanical Journal of the Linnean Society, 163(2): 166-180.

Girlanda M., Segreto R., Cafasso D., Liebel H.T., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S., 2011. Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. American Journal of Botany 98(7): 1148-1163.

McCormick M.K., Taylor D.L., Juhaszova K., Burnett R.K., Whigham D.F., O'Neill J.P., 2012. Limitation on orchid recruitment: not a simple picture. Molecular Ecology 21: 1511-1523.

Perotto S., Rodda M., Benetti A., Sillo F., Ercole E., Rodda M.L., Girlanda M., Murat C., Balestrini R., 2014. Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant-fungus relationship. Planta (Submitted).

Rasmussen H., 1995. Terrestrial Orchids. From Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge: Cambridge University Press.

Roberts P., 1999. *Rhizoctonia*-forming fungi: a Taxonomic guide. London: Kew Publishing.

Stöckel M., Těšitelová T., Jersáková J., Bidartondo M.I., Gebauer G., 2013. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings. New Phytologist 202(2): 606-615.

Swarts N.D., Dixon K.W., 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Annals of Botany 104(3): 543-556.

Waterman R.J., Bidartondo M.I., 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. Journal of Experimental Botany 59(5): 1085-1096.

Riproduzione *in vitro* e coltivazione

Elisabetta Sgarbi e Andrea Pirondini

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia.
E-mail: elisabetta.sgarbi@unimore.it

Le orchidee producono numerosissimi semi, da decine di migliaia ad oltre dieci milioni per pianta (ad esempio in *Maxillaria* spp.), di piccole dimensioni, con una lunghezza che varia infatti da 0,17 a 3,4 mm, e molto leggeri, pochi µg (Arditti & Ghani, 2000). Carattere comune a questi semi, che colloca tutte le orchidee tra le piante micoeterotrofe (Leake, 1994), è lo stabilirsi di una simbiosi micorrizica indispensabile per indurre la germinazione e la successiva crescita nel sottosuolo, poiché in queste fasi le orchidee sono totalmente eterotrofe e dipendenti da funghi simbionti per l'acquisizione di nutrienti. I semi delle orchidee non differenziano alcun tessuto di riserva (endosperma e cotiledone) e solo nelle cellule dell'embrione è possibile mettere in evidenza corpi proteici e lipidici; la germinazione può iniziare anche in assenza del fungo micorrizico, dopo la mobilizzazione di queste sostanze di riserva, l'embrione si ingrossa, rompe i tegumenti e produce rizoidi. Tuttavia è con l'instaurarsi di una simbiosi tra orchidea e fungo che la germinazione può procedere con la differenziazione di un protocormo e lo sviluppo di una plantula. Al di fuori dell'ambiente naturale è possibile ottenere la germinazione delle orchidee solo applicando tecniche *in vitro*, sia in condizioni asimbiotiche che simbiotiche.

Germinazione in vitro - *colture asimbiotiche*

Con il termine "*in vitro*" si fa riferimento alle condizioni di sterilità, stabilite e mantenute per tutta la durata della coltura; anche tutti i parametri chimico-fisici che regolano, nel caso specifico, la germinazione e lo sviluppo sono attentamente controllati. La necessità di disporre di materiale biologico sterile condiziona i trattamenti cui sottoporre i semi prima della semina *in vitro*: per la sterilizzazione della superficie comunemente si utilizzano soluzioni acquose a base di cloro, come l'ipoclorito di sodio o di calcio, con l'aggiunta di detergente. L'obiettivo è raggiungere la massima efficacia nella sterilizzazione senza danneggiare le cellule dell'embrione. Il trattamento con soluzioni ossidanti, ha l'ulteriore obiettivo di agire come

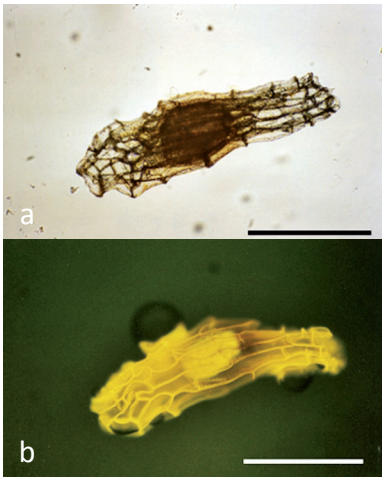
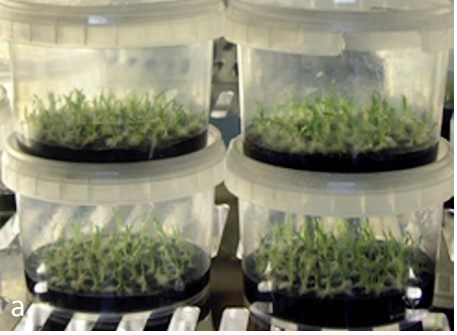


Fig. 1. Seme di *Ophrys apifera* Huds.: a) La colorazione con Sudan Black B per 30 min mette in risalto la presenza di molecole lipidiche nella parete cellulare che rendono il seme impermeabile; b) suberificazione delle pareti cellulari evidenziata dall'autofluorescenza gialla (microscopio ottico a fluorescenza, filtro con lunghezza d'onda massima di eccitazione 420-490 nm; filtro barriera 520 nm). Barra = 0,3 mm (foto E. Sgarbi e A. Pirondini)

scarificazione poiché i semi maturi delle orchidee, con preciso riferimento ai semi delle orchidee terrestri delle zone temperate, presentano tegumenti fortemente impermeabili all'acqua e ai gas. L'impermeabilità è da ricondurre alla suberificazione delle pareti cellulari dei tegumenti (Harvais, 1980) e il grado di suberificazione sembra variare in funzione della specie (Fig. 1). I semi di ogni specie e se possibile anche di ogni accessione necessitano così un trattamento "personalizzato" di sterilizzazione/scarificazione (Van Waes & Debergh, 1986 a, b). La concentrazione della soluzione sterilizzante e la durata del trattamento sono due tra le principali variabili dalle quali dipende il buon esito della semina *in vitro* (Fig. 2 a-b). In alternativa si può utilizzare una tecnica più semplice che consiste nel mettere in coltura semi immaturi, prelevati dal frutto verde (capsula). In questo caso infatti i semi sono idratati e i tegumenti, di colore chiaro, non ancora impermeabili. La procedura prevede il prelievo della capsula intatta, la sua sterilizzazione, l'apertura in condizioni sterilità, sotto cappa a flusso laminare e l'estrazione dei semi sterili che sono delicatamente fatti aderire sulla superficie del terreno di coltura. Il vantaggio di questa tecnica è quello di poter assistere ad una germinazione veloce e massiva, tuttavia è richiesto che le capsule siano raccolte al momento di maturazione ottimale. Inoltre è necessario procedere rapidamente alla semina perché i semi non possono essere conservati (Magrini *et al*., 2011).

La forte dipendenza trofica dai funghi nelle prime fasi di germinazione si riflette direttamente

Fig. 2. *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase: a) Semi in coltura su terreno agarizzato BM1 (Basal Medium modificato) sterilizzati-scarificati superficialmente per 2 min utilizzando una soluzione all'1,5% di ipoclorito di sodio contenente 1% di Tween 20; alcuni semi sono nelle prime fasi di germinazione, gli embrioni si sono rigonfiati, hanno rotto i tegumenti e hanno emesso i primi rizoidi; b) tre piccoli protocormi con rizoidi e alcuni semi non ancora germinati; c) protocormo ben sviluppato con molti rizoidi; d) protocormo con apice verde, comparsa della prima fogliolina; e) plantula con le prime foglie e una piccola radice, visibile a sinistra (freccia); f) plantula di maggiori dimensioni, con radici ben sviluppate. Barra = 1 mm (foto E. Sgarbi e A. Pirondini)



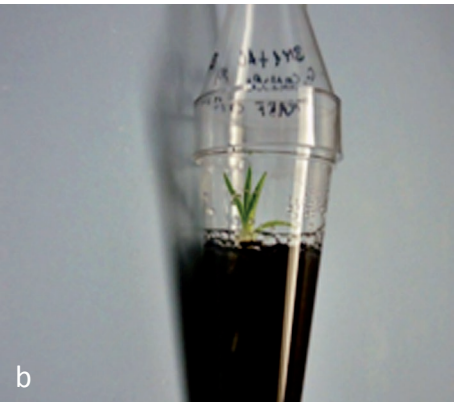


Fig. 3. a) Crescita di plantule di *Anacamptis coriophora* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase all'interno di Microbox dopo 6 mesi dalla semina; b) plantula di *Gymnadenia conopsea* (L.) L. Br. in coltura in provetta De Wit (foto L. Bernardi); c) interno di una cella climatica con colture *in vitro* di orchidee mantenute a 23±0,1°C con fotoperiodo di 12 h luce/buio (Progetto "*Tecniche di propagazione e ambientamento di orchidee autoctone, coltivate* in vitro*, caratteristiche dell'Habitat comunitario 62A0*" - Life Natura LIFE 10/NAT/IT/243 "*Magredi grasslands*" Reg. Friuli Venezia Giulia (foto E. Sgarbi e A. Pirondini)

sulla necessità di fornire nutrienti nel substrato di coltura. Oltre ad una fonte di carboidrati, il saccarosio è il disaccaride più utilizzato, i substrati solitamente comprendono vitamine, sali inorganici di fosforo, magnesio, potassio, ferro, calcio, zolfo, composti azotati e in molti casi anche alcuni microelementi come rame, manganese, zinco, ecc. Molti autori aggiungono al substrato, con ottimi risultati, composti complessi come latte di cocco, polpa di banana, succo di ananas (Oliva & Arditti, 1984; Kitsaki *et al*., 2004; Malmgren & Nyström, 2014).

Un cenno di commento merita l'apporto di azoto: è nota da tempo la difficoltà da parte delle cellule embrionali delle orchidee terrestri ad utilizzare azoto in forma inorganica (Mead & Bulard, 1975; Rasmussen, 1995), tanto che alcune specie germinano solo in presenza di azoto sotto forma di aminoacidi (Sgarbi *et al*., 2009).

In letteratura è riportata una grande mole di dati riguardanti le condizioni ambientali ottimali per indurre la germinazione: generalmente la temperatura è impostata intorno ai 20–25°C; per alcune specie (*Epipactis* spp.) sembra che un pre-trattamento di stratificazione fredda stimoli la germinazione, interrompendo la dormienza dei semi. Anche riguardo alle condizioni luce/buio ci sono diverse esperienze ma molti Autori concordano sul fatto che il buio stimoli la germinazione almeno in gran parte delle orchidee terrestri.

Germinazione in vitro - *colture simbiotiche*

Ampiamente dibattute dalla comunità scientifica sono le questioni relative al rapporto simbiotico orchidea-fungo nelle diverse fasi del ciclo ontogenetico, alla specificità di tale rapporto ed al coinvolgimento di altri partner fotosintetici, in un complesso sistema di relazioni ecologiche

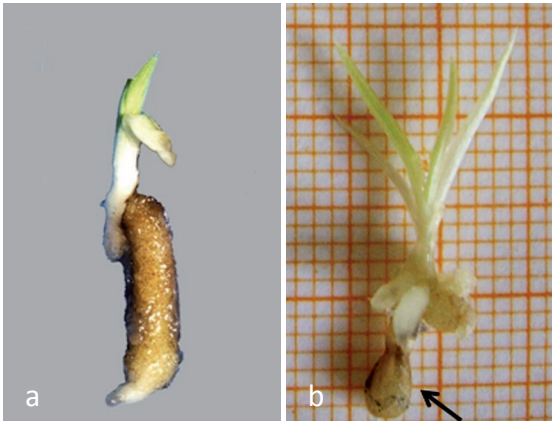


Fig. 4. a) piantina di *Ophrys x arachnitiformis* Gren. & Philippe che si è formata da una gemma sul tubero dell'anno precedente; non è più visibile la vecchia parte epigea; b) Piantina di *Anacamptis coriophora* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase che ha formato il tubero (freccia) dopo 20 mesi circa dalla semina *in vitro* (foto E. Sgarbi e A. Pirondini)

(McKendrick *et al*., 2000; Smith & Read, 2008). Dal punto di vista della riproduzione *in vitro*, l'allestimento di colture simbiotiche risulta vantaggioso in modo particolare per le orchidee terrestri che in queste condizioni mostrano percentuali di germinazione più elevate (Stewart & Kane, 2006); inoltre le colture simbiotiche rappresentano un ottimo modello sperimentale per studiare la specificità e la compatibilità dei micobionti. Anche le plantule cresciute in co-coltura con partner fungini mostrano una crescita maggiore rispetto al controllo non micorrizato e possono essere convenientemente utilizzate per progetti di reintroduzione in aree naturali (Johnson *et al*., 2007).

In realtà l'isolamento di un fungo che risulti compatibile non è semplice. Uno dei metodi più utilizzati consiste nel prelievo di radici micorrizate da piante adulte, nella loro sterilizzazione superficiale con ipoclorito di sodio e nella messa in coltura di sezioni sottili per favorire la crescita delle ife fungine sul substrato agarizzato, *in vitro*. Quando il micelio fungino si è accresciuto è possibile procedere con le prove di co-coltura: i semi sterilizzati in superficie sono posti in coltura con una piccola porzione di substrato sul quale cresce attivamente il fungo. Se il fungo è compatibile i semi germinano rapidamente e producono protocormi micorrizati.

Crescita dei protocormi e delle plantule in vitro

La germinazione e la crescita dei protocormi in coltura procedono generalmente in maniera asincrona, come espressione della variabilità genetica intrinseca in una popolazione di individui derivanti da seme. La sequenza di sviluppo, dalla germinazione allo sviluppo dei protocormi, fino alla formazione di una plantula è mostrata in Figura 2. È possibile osservare che una volta che i protocormi sono portati alla luce si differenziano velocemente le prime foglioline e poi le radici, lateralmente o alla base del protocormo iniziale. I tempi di crescita *in vitro* di orchidee autotrofe sono variabili, ma pochi mesi a volte sono sufficienti per ottenere piantine completamente sviluppate (Fig. 3). Il permanere delle piante *in vitro* permette di osservare anche la formazione del primo tubero o del rizoma (Fig. 4); si tratta di fusti modificati con funzione di riserva e perennanti, che consentono cioè alla pianta di superare la stagione sfavorevole anche dopo il disseccamento della parte epigea, mantenendo le gemme quiescenti. Ci sono evidenze sperimentali riguardo alla criticità delle condizioni di temperatura per la crescita delle plantule *in vitro* e la formazione di organi sotterranei. Il mantenimento di temperature superiori ai 20°C per alcune specie è tanto stressante da portare le piante alla morte. Il trasferimento a basse temperature stimola la crescita e lo sviluppo di foglie, radici e tuberi/rizomi. La formazione di organi perennanti è indispensabile per assicurare la sopravvivenza e la ripresa della crescita dopo il trasferimento alle condizioni *ex vitro* (Pierce, 2011; Ponert *et al*., 2011; Malmgren & Nyström, 2014).

BIBLIOGRAFIA

Arditti J., Ghani A.K.A., 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist 145: 367-421.

Harvais G., 1980. Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of Northwestern Ontario, Canada. American Orchid Society Bulletin 49: 237-244.
Johnson T.R., Stewart S.L., Dutra D., Kane M.E., Richardson L., 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) - preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90: 313-323.
Kitsaki C.L., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S., 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (*Orchidaceae*) Plant Cell Report 23: 284-290.
Leake J.R., 1994. The biology of myco-heterotrophic "saprophytic" plants. New Phytologist 127: 171-216.
Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A., 2011. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*. European Journal of Environmental Science 1: 71-79.
Malmgren S., Nyström H., 2014. http://www.lidaforsgarden.com/Orchids/engelsk.htm, consultato il 21/03/2014.
McKendrick S.L., Leake J.R, Taylor D.L., Read D.J., 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. New Phytologist 145: 523-537.
Mead J.W., Bulard C., 1975. Effect of vitamins and nitrogen source on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. New Phytologist 74: 33-40.
Oliva A., Arditti J., 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species. Botanical Gazette 145: 495-501.
Pierce S., 2011. The conservation of the native orchids of Lombardy. Ceriani R.M. (ed.), Oggiono-Lecco, Italy.
Ponert J., Vosolsobě S., Kmecová K., Lipavská H., 2011. European orchid cultivation- from seed to mature plant. European Journal of Environmental Sciences 1: 95-107.
Rasmussen H., 1995. Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
Sgarbi E., Grimaudo M., Del Prete C., 2009. *In vitro* asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (*Orchidaceae*). Plant Biosystems 143: 114-119.
Smith S.E., Read D.J., 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press and Elsevier, London, UK.
Stewart S.L., Kane M.E., 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (*Orchidaceae*), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 159-167.
Van Waes J.M., Debergh P.C., 1986a. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiologia Plantarum 66: 435-442.
Van Waes J.M., Debergh P.C., 1986b. *In vitro* germination of some Western European orchids. Physiologia Plantarum 67: 253-26.

Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

Le orchidee a rischio di estinzione in Italia

Sara Magrini

Banca del Germoplasma della Tuscia, Università della Tuscia, Viterbo.
E-mail: magrini@unitus.it

Nella *Red List of Threatened Species* (IUCN, 2013) viene riportato lo status di rischio a livello globale solo per 20 specie di orchidee presenti in Italia, mentre la Lista Rossa europea (Bilz *et al*., 2011) elenca 69 specie. Entrambe presentano però un quadro troppo ottimistico della situazione italiana, infatti complessivamente risultano "Minacciate" (EN) solo 6 specie *Epipactis greuteri* H. Baumann & Künkele, *E. placentina* Bongiorni & Grünanger, *E. tallosii* A. Molnár & Robatsch, *Gymnadenia widderi* (Teppner & E. Klein) Teppner & E.Klein, *Orchis patens* Desf. e *Platanthera algeriensis* Batt. & Trab., le prime 4 a rischio anche a livello globale.

Dalle valutazioni effettuate a livello nazionale risulta un quadro decisamente diverso, con 24 specie a rischio di estinzione valutate con le categorie e criteri 2.3 (IUCN, 1994) nelle *Liste Rosse della flora italiana* (Conti *et al*., 1997) e soprattutto con le recenti valutazioni fatte nell'ambito del progetto della Società Botanica Italiana per la redazione di nuove liste rosse con le categorie e criteri 3.1 (IUCN, 2001) che ha portato alla pubblicazione della prima parte della nuova Lista Rossa della Flora spontanea italiana (Rossi *et al*., 2013), relativa alle cosiddette "*Policy Species*", cioè quelle specie elencate negli Allegati della Direttiva Habitat o della Convenzione di Berna, e ad altre specie selezionate perchè di habitat minacciati, come gli ambienti umidi o costieri.

Per la nuova Lista Rossa sono state valutate 15 specie di orchidee, di cui 6 sono risultate a rischio di estinzione.

Le orchidee a maggior rischio in Italia sono: *Dactylorhiza elata* (Poir.) Soó subsp.

Fig. 1: *Dactylorhiza elata* subsp. *sesquipedalis* (foto G. Orrù)

Fig. 2: *Malaxis paludosa* (L.) Swartz (foto I. Edvinsen)

sesquipedalis (Willd.) Soó (Fig. 1) e *Malaxis paludosa* (L.) Swartz (Fig. 2) che risultano entrambe "Gravemente minacciate" (CR).

Dactylorhiza elata subsp. *sesquipedalis* (Fig. 1) è presente in un'unica stazione in Italia, nell'Ogliastra, sulle sponde umide di un torrente nel comune di Osini (NU). La popolazione, costituita da un numero estremamente ridotto di individui maturi (solo 5 nel 2009), è fortemente minacciata dal crescente degrado della qualità dell'habitat, legato principalmente alle opere di sistemazione idraulico-forestali, a cui si devono sommare gli effetti della frequentazione antropica, sia a fini turistico-ricreativi che per finalità scientifiche, soprattutto la raccolta indiscriminata ad opera di appassionati, collezionisti e ricercatori (Fenu *et al*., 2010).

Anche per *M. paludosa* (Fig. 2) si conosce solo una piccola popolazione in Italia. Questa orchidea vive nelle zone sature d'acqua tra gli sfagni delle torbiere alte nel Biotopo Rasner Moser, un SIC in provincia di Bolzano. Risulta minacciata dal basso numero di individui che costituiscono la popolazione (circa 20 piante), ma anche dalla perdita di qualità dell'habitat per l'eutrofizzazione della torbiera e dal calpestio (Mariani & Abeli, 2010).

Altre 4 specie sono state valutate come "minacciate" (EN): *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (Alessandrini & Medagli, 2008), *Spiranthes aestivalis* (Lam.) Rich. (Fig. 3), *Liparis loeselii* (L.) L. (Fig. 4) e *Herminium monorchis* (L.) R.Br. (Fig. 5), tutte orchidee di ambienti minacciati e fragili, come gli ambienti umidi (paludi, prati torbosi, torbiere, prati e pascoli igrofili) dove la riduzione e il degrado stesso degli habitat costituiscono la minaccia principale per le specie che vi vivono.

Fra queste, ricordiamo *Liparis loeselii* (Fig. 4), specie protetta da legislazioni internazionali (Allegati II e IV della Direttiva Habitat; Convenzione di Berna) che cresce in prati umidi torbosi e paludi dell'Italia settentrionale, dove risulta in forte regressione. Anche se le recenti liste rosse europee indicano questa specie come "Quasi a rischio" (NT) (Bilz *et al*., 2011), in Italia è presente con poche popolazioni isolate ed estremamente ridotte (5 sono costituite da un solo individuo!), mostrando un declino continuo anche all'interno di aree protette, dove è minacciata dal degrado e dalla riduzione degli habitat (Orsenigo *et al*., 2012).

Altre orchidee sono attualmente in fase di valutazione. Fra queste, *Epipactis placentina*, già valutata a livello europeo (Bilz *et al*., 2011) e *Limodorum trabutianum* Batt., indicato come "Vulnerabile" nelle precedenti Liste Rosse (Conti *et al*., 1997). Il lavoro di valutazione, quindi, continua ed è importante sottolineare che ci sono ancora molte entità che meritano di essere valutate per la nuova Lista Rossa, partendo per esempio da quelle riportate in precedenza come a rischio (CR, EN o VU). Fra queste sono presenti alcuni endemismi della flora italiana, come *Ophrys tarentina* Gölz & H.R. Reinhard, *O. oxyrrhynchos* (Tod.) Soó subsp. *biancae* (Tod.) Galesi, Cristaudo & Maugeri,

In basso: Fig. 3. *Spiranthes aestivalis* (foto G. Orrù). A lato: Fig. 4. *Liparis loeselii* (foto E. Gransinigh)

Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

Serapias orientalis Nelson subsp. *siciliensis* Bartolo & Pulvirenti o *S. orientalis* Nelson subsp. *apulica* Nelson, alcune specie a distribuzione ristretta, come *Orchis patens* Desf., o specie di habitat minacciati, come *Gennaria diphylla* (Link) Parl. e *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó subsp. *cruenta* (O.F. Müll.) P.D. Sell.

Concludendo, anche se il lavoro di valutazione delle specie italiane è iniziato da poco, è già stato fatto un grosso passo avanti rispetto alla *European Red List*, ma siamo ancora decisamente molto lontani dall'avere una Lista Rossa per le orchidee, uno strumento importante per indirizzare progetti e azioni per una corretta ed efficace conservazione, sia *in situ* che *ex situ*.

Fig. 5: *Herminium monorchis* (foto E. Gransinigh)

BIBLIOGRAFIA

Alessandrini A., Medagli P., 2008. *Orchis palustris* Jacq. In: Rossi G., Gentili R., Abeli T., Gargano D., Foggi B., Raimondo F.M., Blasi C. (Eds.), Flora da conservare: implementazione delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse. Informatore Botanico Italiano 40 suppl.: 93-95.

Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V., 2011. European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: publications office of the european union.

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. WWF Italia, Società Botanica Italiana, Università di Camerino. 139 pp.

Fenu G., Giotta C., Piccitto M., Scrugli A., Bacchetta G., 2010. *Dactylorhiza elata* (Poir.) Soó subsp. *sesquipedalis* (Willd.) Soó. In: Rossi G., Abeli T. (Eds.), Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana. Informatore Botanico Italiano 42 (2): 560-562.

IUCN,1994. IUCN Red List Categories and Criteria version 2.3. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 21 pp.

IUCN, 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 30 pp.

IUCN, 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 13 May 2014

Mariani M.C., Abeli T., 2010. *Malaxis paludosa* (L.) Swartz. In: Rossi G., Abeli T. (Eds.), Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana. Informatore Botanico Italiano 42 (2): 578-579.

Orsenigo S., Perazza G., Arrigoni P., Lorenz R., 2012. *Liparis loeselii* (L.) Rich. In: Rossi G., Foggi B., Gennai M., Gargano D., Montagnani C., Orsenigo S. (Eds.), Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana. Informatore Botanico Italiano 44 (1): 237-239.

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

Conservazione *in situ* e rafforzamento di popolazioni di orchidee spontanee

Simon Pierce[1] e Roberta M. Ceriani[2]

[1]Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, Milano. E-mail: simon.pierce@unimi.it; [2]Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia, c/o Parco Monte Barro, Galbiate (LC)

Le popolazioni di orchidee sono sottoposte a due principali tipi di minacce, la perdita di habitat e la raccolta di esemplari. La prima è rivolta indiscriminatamente a tutte le specie, mentre la seconda rappresenta una minaccia specifica rivolta solo a orchidee particolarmente vistose che vengono raccolte per ignoranza o interessi economici. In ogni caso, a parte la protezione delle specie attraverso apposite normative, la conservazione delle orchidee dipende sostanzialmente da interventi mirati di tutela degli habitat e rafforzamento delle popolazioni con individui ottenuti mediante propagazione *ex situ*. Esempi di simili interventi condotti in Lombardia vengono presentati nel presente articolo.

Le orchidee dei prati e dei pascoli sono piante piccole che necessitano di un ambiente luminoso per catturare abbastanza energia per portare a compimento la fioritura e la fruttificazione (Willems *et al*., 2001; Dorland & Willems, 2006; Jacquemyn *et al*., 2008), e per crescere durante i mesi più freddi dopo che la vegetazione circostante è stata sfalciata o pascolata. Queste forme di disturbo di origine antropica incrementano la biodiversità, mentre quando vengono interrotte, alberi e arbusti invadono i prati riducendo l'energia luminosa al suolo e, a lungo andare, la ricchezza in specie. Ai giorni nostri lo sfruttamento dell'ambiente in termini di sfalcio del fieno, pascolo o taglio del legname è sempre meno frequente, con conseguente abbandono del territorio e perdita di habitat: la conservazione degli habitat dipende sempre più dall'attività di piccoli proprietari terrieri locali che continuano ad operare seguendo pratiche tradizionali. Nel Parco del Monte Barro, vicino a Lecco, i prati esistenti rappresentano un residuo di un sistema molto esteso che in passato consentiva un'agricoltura di sussistenza fornendo fieno per il mantenimento del bestiame per la produzione lattiera e casearia ad uso prevalentemente familiare. In questi prati le orchidee oggi sopravvivono essenzialmente laddove lo sfalcio continua, sebbene l'allevamento di conigli e pollame sia prevalente. Il Parco e i piccoli proprietari solitamente praticano una sfalcio relativamente basso, spesso ad un'altezza di circa 7 cm dal suolo, usando una combinazione di falci e decespugliatori a seconda della natura e della pendenza del terreno (Fig. 1). Pertanto uno dei più importanti fattori per il futuro di molte specie di orchidee potrebbe essere semplicemente il desiderio delle nuove generazioni di continuare a gestire il territorio secondo le pratiche tradizionali. In questo contesto, l'acquisto di alimenti genuini prodotti secondo tradizione incentiva il mantenimento degli habitat e con esso la conservazione della flora.

Alcune orchidee sono rare anche quando le condizioni degli habitat sono ottimali. Per esempio nel Parco del Monte Barro, *Ophrys benacensis* (Reisigl) O. & E. Danesch & Ehrend. e *O. sphegodes* Mill. vivono insieme. La rara ed endemica *O. benacensis* è colorata e visibile, e i suoi fiori sono frequentemente danneggiati o raccolti. Ciò non succede per *O. sphegodes* che ha fiori meno vistosi e che è molto comune a livello locale. Le specie più rare come *O. benacensis* necessitano di un approccio basato sulla coltivazione *ex situ* e il successivo rafforzamento delle popolazioni

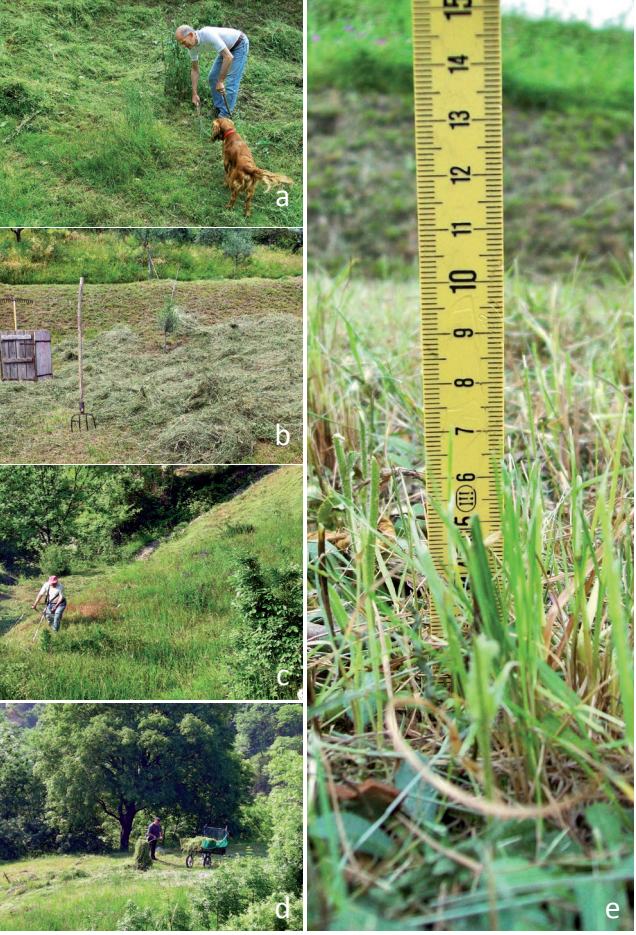


Fig. 1. Lo sfalcio delle praterie calacaree xeriche sul Monte Barro, Lecco (a, b) e nel vicino commune di Valmadrera (c, d) comporta un taglio della vegetazione ad un'altezza di circa 7 cm (e) (foto S. Pierce)

impoverite.

Di seguito si descrive parte dell'attività di propagazione e coltivazione delle orchidee a scopo conservazionistico seguita alla sperimentazione sulla germinazione *in vitro* (Pierce *et al*., 2010, 2013; Pierce & Cerabolini, 2011). Tale attività è culminata nel rafforzamento delle popolazioni di 14 specie di orchidee di pascoli alpini, prati stabili e boschi (Pierce, 2011), con oltre 10.000 individui prodotti *ex situ* durante il progetto ORCHIS (cofinanziato da Fondazione Cariplo e dai Parchi delle Orobie Bergamasche e del Monte Barro).

Coltivazione delle orchidee

Le piante coltivate *in vitro* in condizioni asimbiotiche devono ad un certo punto essere trasferite in terriccio: il successo di questo passaggio fondamentale è determinato dal momento in cui viene effettuato. Di solito il momento ideale è costituito dal periodo di riposo che segue la produzione di un nuovo tubero o l'ingrossamento del rizoma, quando la pianta ha perso le foglie: in genere ciò avviene tra l'inizio e la fine dell'estate. Le orchidee devono quindi essere trasferite solo nella fase di quiescenza, poiché le radici vive sono così delicate da non resistere al disturbo e la pianta in genere muore. I rizomi e i tuberi sono invece organi resistenti e fisicamente duri, che possono essere assimilati a semi, in quanto capaci di sopravvivere a condizioni di marcato disseccamento, e possono pertanto essere maneggiati più facilmente.

Molte orchidee di interesse per la coltivazione a scopi conservazionistici sono specie con tuberi che prediligono prati da sfalcio su substrati calcarei. Alcuni vivaisti specializzati in orchidee utilizzano suoli prelevati direttamente in natura per riprodurre correttamente la chimica del substrato ed ottenere facilmente i funghi micorrizici. Tuttavia questo approccio non è ideale perché comporta un disturbo dell'habitat e comunque buoni risultati possono essere ottenuti anche con un terriccio in assenza di micorrize: è stato infatti osservato che quando le orchidee sono trapiantate in natura, la simbiosi micorrizica si forma spontaneamente in poche settimane (Sgarbi *et al*., 2001), e molte specie possono sfruttare qualsiasi fungo saprofita presente nelle vicinanze (Jacquemyn *et al*., 2010). Un substrato artificiale semplice adatto alla coltivazione delle orchidee dei prati stabili è costituito da terriccio universale mischiato con sfagni, sabbia e perlite in rapporto 5:3:2:1 (Fig. 2). Calcare può essere aggiunto per correggere l'acidità del suolo, tenendo presente che il pH naturale è di circa 7,2-8,0. La sabbia è forse la componente più importante perché garantisce il drenaggio dell'acqua, necessario per evitare la rapida marcescenza delle radici

nella maggior parte delle orchidee (eccezioni sono le specie delle zone umide come *Epipactis palustris* (L.) Crantz e *Dactylorhiza traunsteineri* (Saut. ex Rchb.) Soó). Le specie nemorali come *Cypripedium calceolus* L. e *Goodyera* spp. possono essere coltivate in lettiera di foglie o fibra di cocco. In tutti i casi tuberi e rizomi dovrebbero essere piantati ad una profondità pari al loro massimo diametro; per le specie più piccole tre o quattro individui possono essere messi a dimora in un unico vasetto.

Il trasferimento delle giovani piante dalle condizioni *in vitro* al vaso comporta una drastica riduzione dell'umidità atmosferica: per questa ragione i coperchi dei contenitori usati *in vitro* per le prime fasi di sviluppo, possono essere "riciclati" come piccole serre per mantenere l'umidità intorno alle piantine (Fig. 3a,b). In questi contenitori, le piante devono essere poste in luoghi costantemente ombreggiati, lontani dalla luce diretta del sole. Un paio di giorni dopo il trapianto i coperchi possono essere sollevati da un lato in modo da abbassare gradualmente l'umidità relativa e dopo circa due settimane possono essere completamente rimossi.

Fig. 3. Coltivazione in vaso di orchidee presso il Centro Flora Autoctona: (a) *Ophrys sphegodes*; (b) i coperchi dei contenitori usati per la propagazione *in vitro*, riciclati per mantenere l'umidità intorno alle piante dopo il trapianto; (c) ghiaietto usato per contenere la copertura di muschio intorno a *Pseudorchis albida* (foto S. Pierce)

L'irrigazione è un problema durante l'intera coltivazione. Grossi vasi di plastica trattengono troppa acqua, mentre quelli di terracotta la perdono troppo velocemente a meno di essere immersi in sabbia umida, tecnica che richiede però bancali da serra specialistici: secondo l'esperienza acquisita con il progetto ORCHIS, vasi quadri in plastica di 6x6 cm rappresentano un buon compromesso. L'irrigazione può essere effettuata in automatico purché il substrato possa asciugarsi leggermente tra le annaffiature. Un sottile strato di ghiaietto può essere steso sulla superficie del terriccio, in modo da consentire la crescita delle foglie delle orchidee, ma non la formazione di muschi ed epatiche (Fig. 3c; gli erbicidi specifici per Briofite uccidono le orchidee). L'umidità relativamente elevata favorisce anche le lumache, che insieme ai grilli rappresentano la principale minaccia per le foglie: le lumache possono essere controllate con le apposite esche o essere rimosse manualmente. Anche gli afidi possono attaccare la base delle foglie, i boccioli e i frutti, ma possono essere contenuti con uno spray di acqua saponata. Trappole cromotropiche possono infine essere posizionate in prossimità del terreno per controllare gli sciaridi.

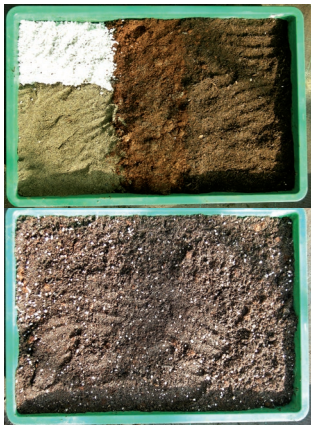


Fig. 2. Il substrato di coltivazione delle praterie di prato è costituito da una miscela di terriccio universale, sfagni, sabbia e perlite in rapporto 5:3:2:1 (Foto S. Pierce)

Le piante necessitano di almeno un anno di sviluppo e crescita in vaso prima di fiorire. La maggior parte delle orchidee di prato inizia a produrre una rosetta di foglie

in settembre; la rosetta sarà visibile per tutto l'inverno e da essa si originerà l'infiorescenza in primavera (Fig. 4). L'irrigazione deve essere ridotta nella tarda primavera e poi cessare in estate: le piante perdono le foglie, mentre sopravvive la porzione ipogea. Nell'autunno successivo alla comparsa della prima foglia è necessario riprendere l'irrigazione.

Reintroduzioni e rafforzamenti

La messa a dimora delle orchidee in natura deve essere pianificata in relazione a considerazioni etiche e legali. Nel presente lavoro si fa riferimento alla situazione lombarda e in particolare alla Legge Regionale 31 marzo 2008 n. 10. Il rafforzamento di popolazione (*restocking*) consiste nell'immissione di nuovi individui in una popolazione esistente, e dovrebbe essere effettuato partendo da germoplasma della medesima popolazione o di quelle più vicine in modo da minimizzare l'inquinamento genetico. Per reintroduzione si intende invece la creazione di una popolazione in un'area in cui la specie è estinta, ma per cui esistono dati storici di una sua passata presenza. In Lombardia è necessario ottenere un permesso sia per il *restocking* che per la reintroduzione, presentando un progetto coordinato da personale tecnico qualificato e comunicando alle autorità i risultati ottenuti. Informazioni e documentazione in merito sono reperibili su un sito web dedicato (www.biodiversita.lombardia.it). La legge regionale sopra citata vieta invece le introduzioni, intese come immissioni di una nuova popolazione di una specie alloctona, ovvero non precedentemente presente nell'area di intervento. Le introduzioni e le migrazioni assistite possono essere eticamente corrette solo nel caso in cui le specie in questione siano particolarmente rare e il loro habitat naturale sia fortemente minacciato, ma la legge non è chiara su questo punto.

Fig. 4. Sviluppo delle piante in serra: *Ophrys sphegodes* a due anni dalla semina (a) e a tre anni dalla semina in fioritura (b); *O. benacensis* in fioritura (c), numerose *O. sphegodes* in fioritura (d) (Foto S. Pierce)

Per quanto riguarda le orchidee, il ripopolamento deve essere effettuato quando le piante sono in fase di riposo, mettendo a dimora i tuberi. In Fig. 5a vengono mostrati vassoi contenenti i tuberi di *O. benacensis*, poco prima di essere piantati in buche poco profonde (1-2 cm; Fig. 5b) e coperti con il terreno; l'innaffiatura immediata è fondamentale per permettere al suolo di aderire ai tuberi. La Fig. 5c mostra la messa a dimora dei tuberi da parte di un volontario, mentre in Figg. 5d e 5e si può osservare la crescita autunnale delle foglie di *O. benacensis* e *O.*

Fig. 5. Rafforzamento delle popolazioni di *Ophrys* sul Monte Barro nel 2010: a) vasi contenenti i tuberi di *O. benacensis*; b) tubero di tre anni di *O. apifera*; c) trapianto di tuberi di *O. benacensis* da parte di un volontario; rosette di *O. benacensis* (d) e *O. apifera* (e) nell'autunno successivo (Foto S. Pierce)

apifera Huds. rispettivamente.

Nel Parco del Monte Barro, questo tipo di intervento ha portato al ripopolamento di *O. apifera* moltiplicando la popolazione originaria di 15 volte rispetto alla consistenza originaria (Pierce *et al.*, 2013; Fig. 6a), mentre piante di *O. sphegodes* prodotte *in vitro* sono state usate per la realizzazione di aiuole didattiche aperte al pubblico (Fig. 6b). Complessivamente 175 piante di *O. benacensis* sono state immesse in natura; 35 di queste sono fiorite nel 2013, cinque anni dopo la semina *in vitro* (Fig. 6c,d). La popolazione naturale di questa rara specie endemica era costituita da solo 10 individui: l'intervento ha quindi comportato la moltiplicazione della popolazione originaria di ben 17 volte. I risultati ottenuti dimostrano che gli interventi di reintroduzione e rafforzamento di popolazione possono avere un impatto notevole sulle specie più rare di orchidee, nonostante le difficoltà e la lentezza che ne caratterizzano la coltivazione *ex situ*.

BIBLIOGRAFIA

Dorland E., Willems J.H. 2006. High light availability alleviates the costs of reproduction in *Ophrys insectifera* (*Orchidaceae*). Journal Europäischer Orchideen 38(2): 501-518.

Jacquemyn H., Brys R., Honnay O., Hermy M. 2008. Effects of coppicing on demographic structure, fruit and seed set in *Orchis mascula*. Basic and Applied Ecology 9: 392-400.

Jacquemyn H., Honnay O., Cammue B.P.A., Brys R., Lievens B. 2010. Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. Molecular Ecology 19: 4086-4095.

Pierce S. 2011. The Conservation of Terrestrial Orchids. Parco delle Orobie Bergamasche, Bergamo, Italy. ISBN 978-88-906196-1-8.

Pierce S., Ferrario A., Cerabolini B. 2010. Outbreeding and asymbiotic germination in the conservation of the endangered Italian endemic orchid *Ophrys benacensis*. Plant Biosystems 144(1): 121-127.

Pierce S., Cerabolini B.E.L. 2011. Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones. Seed Science & Technology 39: 199-203.

Pierce S., Guidi V., Ferrario A., Ceriani R.M., Labra M., Vagge I., Cerabolini B.E.L. 2013. Pea seed extracts stimulate germination of the terrestrial orchid *Ophrys apifera* Huds. during a habitat restoration project. Plant Biosystems (in press) DOI: 10.1080/11263504.2013.809814.

Regione Lombardia. 2010. Flora e piccola fauna protette in Lombardia. Centro Flora Autoctona

della Regione Lombardia (CFA).
Sgarbi E., Prete C.D., Ronconi L., Dallai D. 2001. Asymbiotic micropropagation of wild Italian orchids: from seed to plant in a project for *in situ* reintroduction. Journal Europäischer Orchideen 33(1): 395-404.
Willems J.H., Balounová Z., Kindlmann P., 2001. The effect of shading on seed production and plant survival in the threatened species *Spiranthes spiralis* (*Orchidaceae*). Lindleyana 16: 31-37.

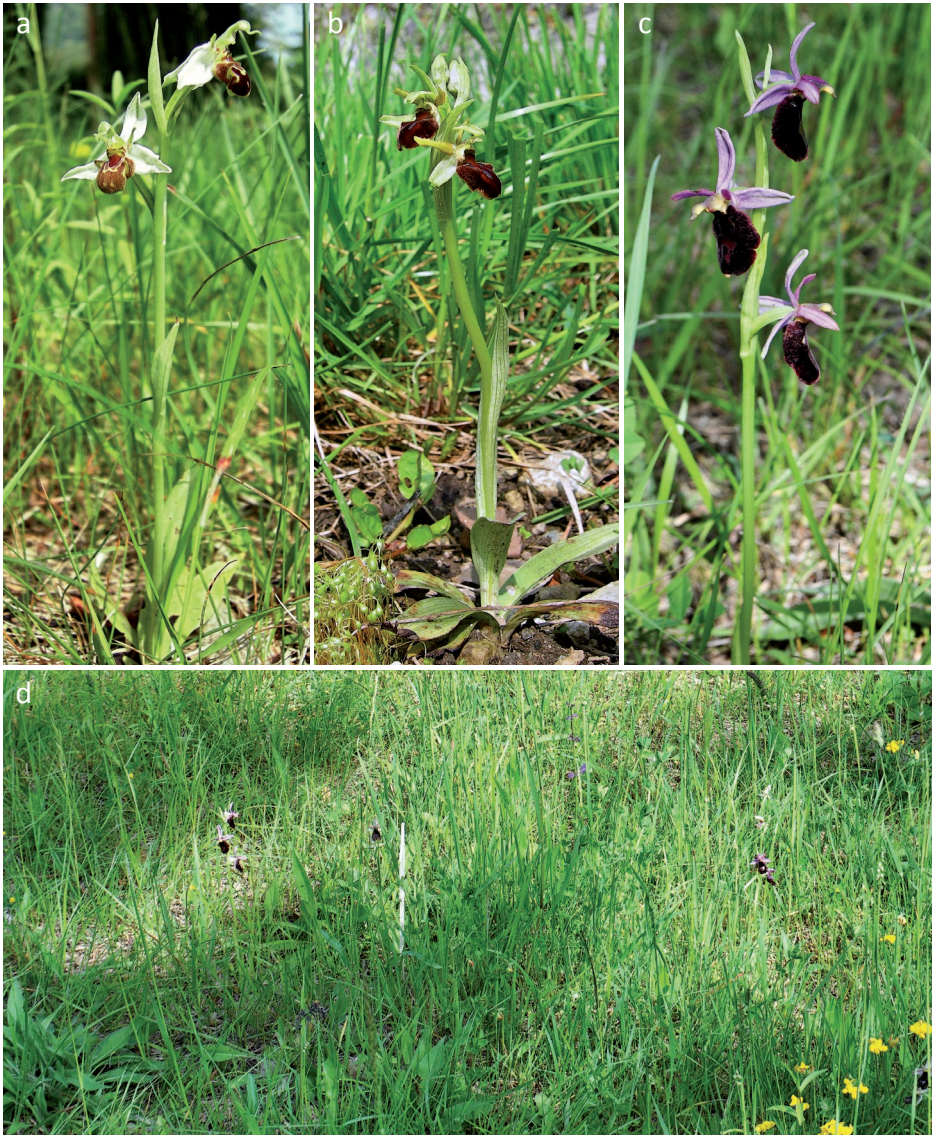


Fig. 6. Fioritura delle piante nel 2013, sei anni dopo la semina *in vitro*: a) *O. apifera* (foto S. Pierce); b) *O. sphegodes* in un'aiuola dimostrativa in Villa Bertarelli, sede del Parco Monte Barro (foto S. Pierce); c) *O. benacensis* prodotte *in vitro* (foto P. Arrigoni) e d) in fioritura in natura (foto P. Arrigoni)

Conservazione *ex situ*: esperienze in orti botanici e banche del germoplasma

Sara Magrini

Banca del Germoplasma della Tuscia, Università della Tuscia, Viterbo.
E-mail: magrini@unitus.it

Nel 1992, con la Convenzione sulla Diversità Biologica viene sottolineata la priorità della conservazione *in situ* per la conservazione della biodiversità a lungo termine (Art. 8), notando tuttavia che non è sempre possibile da applicare e che in molti casi non riesce a garantire la piena salvaguardia delle specie. Viene quindi riconosciuto l'importante ruolo di supporto di tutte quelle attività *ex situ* che possono fornire una reale garanzia di sopravvivenza delle specie a rischio di estinzione in natura (Art. 9), assicurando la conservazione a lungo termine di materiale genetico autoctono per eventuali reintroduzioni, incentivando gli studi sull'ecologia o biologia riproduttiva delle specie e promuovendo l'educazione ambientale. Una concezione moderna di conservazione della biodiversità deve quindi prevedere l'integrazione di attività *in situ* ed *ex situ*, con un approccio multidisciplinare e trasversale.

Da sempre gli Orti Botanici hanno avuto il compito di conservare *in vivo* specie da tutto il mondo, garantendone la conservazione *ex situ*, attraverso la coltivazione la loro propagazione, e svolgendo un ruolo fondamentale nel divulgare l'importanza della biodiversità.

Più recente e, forse meno conosciuto, è il ruolo delle banche dei semi o banche del germoplasma per la conservazione *ex situ*. Le banche del germoplasma sono vere e proprie "banche" dove conservare a lungo termine semi o spore di specie a rischio di estinzione, ma anche dove riprodurre specie ormai scomparse in natura per eventuali reintroduzioni. Sempre più spesso le banche del germoplasma affiancano orti botanici e aree protette in progetti integrati per la conservazione della diversità vegetale.

Per quanto riguarda la conservazione delle orchidee in Italia, però, questa integrazione non è ancora così comune. Sono molti gli orti botanici che hanno realizzato negli ultimi anni collezioni di orchidee spontanee di vario tipo, accompagnate da pannelli divulgativi ed utilizzate per attività didattiche e di divulgazione scientifica, parte fondamentale di ogni progetto di conservazione. Sono, invece, ancora molto poche le banche del germoplasma che si occupano della conservazione dei semi delle orchidee spontanee e della loro riproduzione, forse per alcune difficoltà legate alla complessità della loro biologia riproduttiva ed ecologia o per la necessità di utilizzare tecniche specifiche per la germinazione e riproduzione *in vitro*.

Sono riportate di seguito solo alcune delle molte esperienze di conservazione *in situ/ex situ* in corso in aree protette, in orti botanici, in banche del germoplasma e criobanche, nella speranza che possano essere di stimolo per intraprendere analoghi progetti e attività per incrementare la conservazione delle orchidee in tutta Italia.

Monitoraggio e azioni sul popolamento di *Cypripedium calceolus* nel Parco Nazionale della Majella

Giampiero Ciaschetti e Luciano Di Martino

Ente Parco Nazionale della Majella, loc. Badia Morronese, Sulmona (AQ).
E-mail: giampiero.ciaschetti@parcomajella.it; luciano.dimartino@parcomajella.it.

La Scarpetta di Venere, *Cypripedium calceolus* L. (Fig. 1) è presente in un unico popolamento lungo la Valle di Macchia Lunga di Fara San Martino (CH) (Fig. 2; Conti & Pellegrini, 1989), in un sito di crescita che vede nello spazio di poche centinaia di metri la presenza di altre specie molto rare: il Caprifoglio nero (*Lonicera nigra* L.), arbusto ampiamente diffuso sulle Alpi e nell'Europa centrale, ma che sull'Appennino centro-meridionale è al limite del proprio areale di distribuzione e segnalato solo in questa stazione; il Rovo erbaceo (*Rubus saxatilis* L.), il Mirtillo nero (*Vaccinium mirtyllus* L.) ed il Mughetto (*Convallaria majalis* L.), poco comuni nell'intero arco appenninico; la Piroletta verdastra (*Pyrola chlorantha* Sw.), presente in Abruzzo solo in un'altra stazione nel Parco Nazionale d'Abruzzo; la Betulla (*Betula pendula* Roth), presente anch'essa nel Parco con quest'unico popolamento. L'analisi fitosociologica della comunità in cui vegetano i pochi esemplari di Scarpetta di Venere ha evidenziato un aspetto pioniero di transizione tra la faggeta microterma del *Cardamino kitaibelii-Fagetum sylvaticae* Ubaldi *et al*. ex Ubaldi 1995 e l'arbusteto prostrato a *Pinus mugo* dell'*Helianthemo grandiflori-Pinetum mugo* Stanisci 1997, corrispondenti agli habitat prioritari 4070* "Boscaglie di *Pinus mugo* e *Rhododendron hirsutum* (*Mugo-Rhododendretum hirsuti*)" e 9210* "Faggete degli Appennini con *Taxus* e *Ilex*", con elementi dei ghiaioni dell'alleanza *Linario-Festucion dimorphae* Avena et Bruno 1975 em. Feoli Chiapella 1983.

Fig.1. *Cypripedium calceolus nel Parco* (foto L. Di Martino)

La rara orchidea è tutelata da Direttiva Habitat, CITES e Convenzione di Berna ed è inclusa nelle Liste Rosse Regionali delle piante d'Italia (Conti *et al*., 1997), nella nuova Lista Rossa della flora italiana (Rossi *et al*., 2013), nella Lista Rossa Europea delle piante vascolari (Bilz *et al*., 2011); la specie è anche oggetto di uno specifico piano d'azione del Consiglio d'Europa (1999). Sulla Majella, una specifica indagine demografica ed ecologica viene condotta già da diversi anni da parte dell'Ente Parco, in collaborazione con il CTA del Parco (Corpo Forestale dello Stato) e con l'Università degli Studi dell'Aquila. Opportune azioni vengono messe in atto al fine di preservarne il germoplasma e garantirne la riproduzione *in situ*.

Da diversi anni viene monitorata la popolazione, con la conta degli individui, dei fiori e dei frutti (Ciaschetti, 2007, 2010). L'analisi dei dati dimostra un trend in continuo ed inesorabile declino, con ratei di fioritura bassi e di fruttificazione addirittura drammatici.

Tra le azioni di monitoraggio della popolazione

della specie è stata effettuata l'analisi degli insetti impollinatori: essa riveste notevole importanza per l'individuazione delle dinamiche riproduttive delle specie, step investigativo fondamentale nell'approfondimento dell'autoecologia delle specie. Le indagini sono state condotte nei mesi di maggio, giugno e luglio per gli anni 2008, 2009, 2010 e 2011 (Di Martino, 2008; Biondi, 2012); finora i risultati, che lungi dall'essere esaustivi, necessitano di ulteriori approfondimenti, hanno confermato la presenza del piccolo imenottero del genere *Andrena*, genere di insetti apoidei della famiglia *Andrenidae*, a distribuzione cosmopolita, già individuato anche sulle popolazioni del Trentino Alto Adige (Bonazza *et al*., 2004), quale impollinatore di varie specie di orchidee, tra cui *Cypripedium calceolus*. Inoltre sono stati individuati altri impollinatori facoltativi non specie-specifici appartenenti rispettivamente agli ordini dei Ditteri (*Diptera – Syrphidae*), con gli esemplari della specie *Platycheirus albimanus*, e dei Coleotteri (*Coleoptera –Staphylinidae*, *Dasytidae*) con gli esemplari dei generi *Danacea* e *Eusphalerum*.

Fig. 2. La Valle di Macchialunga a Fara San Martino (CH) (foto L. Di Martino)

Nel 2010 per il popolamento di *Cypripedium calceolus* è stato realizzato un leggero sfoltimento dei rami e degli esemplari giovani di Faggio, su una superficie di circa 300 m^2, peraltro già effettuato in passato dall'Ente, con il supporto del personale CTA - Corpo Forestale, allo scopo di produrre una migliore esposizione delle piante alla luce, cosa che favorisce la fioritura e la visita dei pronubi (Rossi W., *in verbis*). Il materiale di risulta ottenuto dagli interventi di sfoltimento è stato accatastato all'interno dei siti di indagine, a formare cataste alte 40-50 cm e lunghe 1-2 m, allo scopo di favorire la presenza di insetti, anfibi, rettili e micromammiferi, in quanto possibili microaree di rifugio e di ricovero.

BIBLIOGRAFIA

Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V., 2011. European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: publications office of the european union.

Biondi M., 2012. Studio degli insetti impollinatori di 5 specie della flora di pregio del Parco Nazionale della Majella. Rapporto tecnico finale. Università degli Studi dell'Aquila - Parco Nazionale della Majella.

Bonazza A., Caniglia G., Moraldo B., & Rossi W., 2004. Preliminary Data on the Ecology of *Cypripedium calceolus* L. in a few Populations from the Trentino Alto Adige. Journal Europäischer Orchideen 36(2): 431-454.

Ciaschetti G., 2007, 2010. Monitoraggio della flora di pregio del Parco Nazionale della Majella. Relazioni tecniche. Parco Nazionale della Majella

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. WWF Italia, Società Botanica Italiana, Univ. Camerino. 139 pp.

Conti F., Pellegrini M., 1989. Secondo contributo alla Flora della Majella. Archivio Botanico Italiano 64 (1-2) (1988): 34-42.

Di Martino L., 2008. Studio degli insetti impollinatori delle specie della flora di pregio del Parco Nazionale della Majella. Relazione tecnica Parco Nazionale della Majella.

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

Conservazione *in situ/ex situ* di orchidee nella Provincia di Livorno

Gruppo Botanico Livornese e Sezione Livornese GIROS
in collaborazione con il Museo di Storia Naturale del Mediterraneo

Conservazione in situ *della diversità vegetale minacciata*

a cura di Mairo Mannocci (presidente del G.B.L.) e Iolanda Legitimo (socio G.B.L. e coordinatrice della sezione GIROS). E-mail: mairomannocci@alice.it

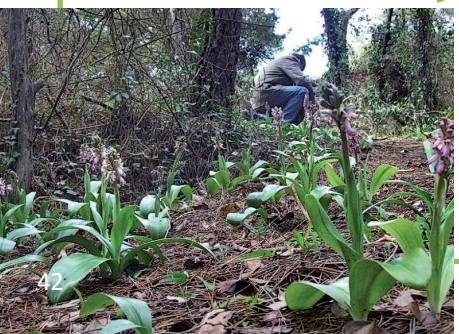
Le ricerche floristiche svolte dalle due associazioni operanti all'interno del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo, Sezione Livornese GIROS e G.B.L., si sono intensificate negli ultimi anni, con l'inizio nel 2009 del "Progetto Orchidea", con risultati importanti, che sono stati oggetto di pubblicazioni su GIROS Notizie. Nel territorio della provincia di Livorno, caratterizzato dalla presenza di oltre 60 tra specie e sottospecie di orchidee, si contano numerosi casi di ambienti ricchi di orchidee rare per i quali sussiste una notevole preoccupazione data l'estrema criticità degli habitat che mette in pericolo la loro persistenza.

- *Lista di Attenzione*

È stata redatta una "Lista Provinciale di Attenzione" composta da 34 entità scelte perchè rare o rarissime in Italia, endemiche, ad areale ampio ma rare, in rarefazione o addirittura in pericolo di estinzione nel nostro territorio. Alcune specie sono ridotte a così pochi esemplari, da far pensare ad una loro prossima scomparsa locale, per la riduzione degli habitat o per l'azione degli ungulati. L'elenco delle orchidee spontanee da salvaguardare verrà periodicamente aggiornato compilando nuove Liste di Attenzione per la provincia di Livorno, alla luce di ulteriori e più approfondite ricerche sul territorio.

Fig. 1. *Cephalanthera longifolia* tra le dune del giardino "La Soldanella" con Mauro Biagioli (presidente di GIROS)

Fig. 2. *Barlia robertiana* all'ingresso del giardino "La Soldanella"



- *Studio delle criticità degli habitat*

Un nostro obiettivo è innanzitutto quello di studiare le criticità degli habitat nei quali le specie indicate come rare sono esposte a varie situazioni pericolose per la loro sopravvivenza. Una delle criticità è rappresentata dalla modificazione delle associazioni vegetali, che impedisce la stabilità delle condizioni favorevoli. Spesso gli habitat vengono distrutti completamente per le diverse attività umane, lecite ed illecite (agricoltura, pastorizia, incendi, calpestio, lavori stradali, introduzione di ungulati).

- *Progetto del Giardino Botanico dunale "La Soldanella"*

Questo progetto è scaturito da una richiesta di collaborazione da parte di privati, proprietari di un appezzamento di terreno (macchia mediterranea e zona retrodunale) in località Marina di Castagneto Carducci con l'intento di conservare l'ambiente al naturale e allestirvi un percorso guidato a carattere didattico. Partecipano a questo progetto il G.B.L., il Museo di Storia Naturale del Mediterraneo e la Sezione

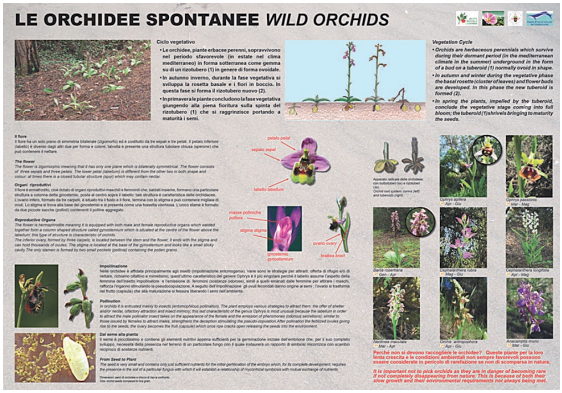


Fig. 3. Pannello sulle orchidee spontanee esposto nel giardino

Livornese G.I.R.O.S. In accordo tra le parti viene attuata la conservazione *in-situ* delle specie (alcune sono inserite nella Lista Rossa provinciale) presenti nel giardino stesso: *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, *A. papilionacea* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch (Fig. 1), *C. rubra* (L.) Rich., *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter. (Fig. 2), *Neotinea maculata* (Desf.) Stearn, *Orchis anthropophora* (L.) All., *Ophrys apifera* Huds., *O. sphegodes* Mill. subsp. *classica* (Devillers-Tersch. & Devillers) Kreutz, *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. Sono stati inseriti alcuni esemplari di specie rare come *Ophrys argolica* Fleishm. subsp. *crabronifera* (Sebast. & Mauri) Faurh, *O. exaltata* Ten. subsp. *montis-leonis* (O. Danesch & E. Danesch) Soca e *O. passionis* Sennen ex Devillers & Devillers, presenti nei dintorni del giardino stesso ma in pericolo per la raccolta da parte dell'uomo e lo scavo da parte di roditori che se ne nutrono. L'attività iniziata nel 2011 con i primi contatti, si è meglio definita nel 2012 con sopralluoghi e studi che hanno portato ad allestire pannelli didattici all'aperto, di cui uno riguardante anche le orchidee del giardino (Fig. 3).

- *Educazione e divulgazione scientifica*

Vengono condotte varie attività a cura di Iolanda Legitimo per promuovere l'educazione e la divulgazione scientifica sul problema della conservazione della diversità vegetale, in generale, e delle orchidee spontanee in particolare.

Conservazione ex situ*: allestimento di una collezione di orchidee spontanee presso l'Orto Botanico del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo*

a cura di Bruno Quochi (socio del consiglio G.B.L.) e Antonio Borzatti (curatore dell'Orto Botanico e responsabile dei laboratori)

Come già accennato, la conservazione *ex situ* è importante come strumento di supporto per favorire quella *in situ* con la possibilità di reintroduzione in natura, anche in gran numero, di nuovi individui riprodotti in laboratorio a partire da poche piante prelevate oppure dai semi raccolti in natura, dopo che sono state ridotte o eliminate le cause del degrado. Allo scopo abbiamo allestito, all'interno dell'Orto Botanico del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo, una piccola collezione di orchidee spontanee. Le specie inserite non hanno problemi di sopravvivenza in natura, raccogliendo pochi esemplari a fine ciclo vegetativo con pane di terra ridotto. Tra

Fig. 4. *Anacamptis laxiflora* coltivata presso il laghetto del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo

Fig. 5. *Ophrys passionis* coltivata nell'Orto Botanico del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo

le specie raccolte risalta la bellissima *Barlia robertiana*, ma anche *Anacamptis papilionacea*, *A. laxiflora* (Lam.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (Fig. 4), *Ophrys apifera*, *O. sphegodes*, *O. passionis* (Fig. 5), *Serapias lingua* L., *Orchis purpurea* Huds. (Fig. 6), che seppure meno significative dal punto di vista della conservazione sono altrettanto importanti per le loro caratteristiche botaniche, riproduttive ed ecologiche, utili per la sperimentazione e messa a punto delle tecniche di riproduzione *in vitro*.

Riproduzione in vitro *presso i laboratori del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo*

a cura di Viviano Mazzoncini (socio del consiglio G.B.L.) e Antonio Borzatti (curatore dell'Orto Botanico e responsabile dei laboratori)

Altro obiettivo fondamentale del progetto, non ancora realizzato, è quello di sperimentare la riproduzione *in vitro* asimbiotica selezionando diversi terreni di coltura caratterizzati da un diverso contenuto in nutrienti e sviluppati sulla base dei più recenti reports bibliografici allo scopo di individuare le esigenze colturali per la germinazione asimbiotica *in vitro* di ciascuna specie in orto. Nel caso in cui le procedure di germinazione ottengano i risultati sperati con le piante presenti nell'Orto Botanico, sarà naturale tentare successivamente di applicarle anche ad altre specie non trasferite nell'Orto, mediante raccolta dei frutti direttamente da piante presenti in natura, con particolare attenzione a quelle specie a rischio di estinzione per il territorio livornese, per una loro eventuale reintroduzione in habitat. Fine ultimo delle sperimentazione sarà la reintroduzione delle piante ottenute dalla propagazione *in vitro* nel loro habitat naturale in determinati siti scelti tra quelli che garantiranno il minor disturbo possibile alla loro vita, per valutarne le prestazioni in termini di sopravvivenza. Tali obiettivi potranno essere raggiunti mediante gli strumenti della Banca del germoplasma e con l'ausilio delle apparecchiature del laboratorio di genetica del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Barsotti G. et al., 2008. *Orchis palustris* Jacq.: indagine floristico-vegetazionale e genetica della stazione toscana del lago dell'Accesa (GR). GIROS Notizie 38: 19-23.

Filippi L., 1999. Le *Barlia* della pineta di Donoratico. GIROS Notizie 11: 16.

Frangini G., 2002. Nuova stazione di *Ophys ciliata* Biv. all'isola d'Elba (Arcipelago Toscano, Livorno). GIROS Notizie 20: 6-7.

Frangini G., 2003. Attività del GIROS all'Isola d'Elba. GIROS Notizie 24: 3-4.

Frangini G., 2004. *Gennaria diphylla* (Link) Parl., primo ritrovamento in Toscana (Isola d'Elba). GIROS Notizie 27: 28-30.

Frangini G., Romolini R., Sodi F., Bisti M., Filippi L., Mannocci M., Quochi B., 2005. Orchidee dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). GIROS Notizie 28: 1-16.

Frangini G., Romolini R., Sodi F., Bisti M., Filippi L., Mannocci M., Quochi B., 2006. Orchidee dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). Nota aggiuntiva. GIROS Notizie 33: 7-15.

Frangini G., Romolini R., Sodi F., Parri F., Cortesi G. & Giorgi T., 2008. *Serapias strictiflora* Welwitsch ex Veiga: prima segnalazione per l'Italia. GIROS Notizie 39: 22-24.

Frangini G., Romolini R., Sodi F., Bisti M., Forbicioni L., Cortesi G., 2007.
Orchidee dell'isola di Pianosa (Arcipelago Toscano). GIROS Notizie 36: 11-26.
Frangini G., Romolini R., Sodi F., Bisti M., Forbicioni L., Cortesi G., 2012. Orchidee dell'isola di Giannutri (Arcipelago Toscano). GIROS Notizie 51: 88-93.
Frangini G., Romolini R., Sodi F., Bisti M., Forbicioni L., Cortesi G., 2014. Orchidee dell'Isola del Giglio (Arcipelago Toscano). GIROS Notizie 55: 25-42.
Gestri G., Biagioli M., 1999. *Ophys speculum* nella provincia di Livorno. GIROS Notizie 12/13: 23-24.
Lazzeri V., Sammartino F., 2010. *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce: prima segnalazione per la provincia di Livorno. Quaderni del Museo di Storia Naturale di Livorno 23: 69-72.
Mannocci M., 2001. *Orchis longicornu* Poir.: primo ritrovamento toscano sui Monti Livornesi. GIROS Notizie, 18: 35-36.
Tabone M., 2002. *Dactylorhiza insularis* (Sommier) Landwehr: primo ritrovamento sui Monti Livornesi. GIROS Notizie 23: 8-9.

Fig. 6. *Orchis purpurea* coltivata nell'Orto Botanico del Museo di Storia Naturale del Mediterraneo

Le orchidee spontanee della Toscana Centro-Meridionale

Ilaria Bonini, Paolo Castagnini e Simona Maccherini

Orto Botanico -Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli studi di Siena
E-mail: ilaria.bonini@unisi.it; www.museobotanico.unisi.it

Alla fine degli anni '90 nell'Orto Botanico dell'Università di Siena è iniziata una nuova progettualità per l'ampliamento dell'offerta didattica, basata sulla conoscenza e divulgazione della biodiversità naturale della Toscana. Tale finalità scientifico/didattica si è concretizzata con la ricostruzione di ambienti naturali: un giardino roccioso, con flora locale legata alle rocce calcaree, silicee e ultramafiche; un'area rocciosa con stillicidio per la presentazione di alcune delle più comuni pteridofite indigene; la messa a dimora di orchidee spontanee della Toscana centro-meridionale. Queste collezioni permettono di far conoscere alle scolaresche e al pubblico in genere, un sempre maggior numero di specie spontanee della Toscana, con l'intenzione di portare il visitatore a rispettare e conservare la natura e particolari entità vegetali a rischio di estinzione. Grazie all'attenzione dedicata al problema della tutela della natura, la Regione Toscana con la legge 56/2000, ha riconosciuto gli Orti botanici della Toscana come Centri per la conservazione *ex-situ* della flora (C.E.S.FL.). Questa identificazione permette all'Orto Botanico di attivare progetti di conservazione e di monitoraggio della flora autoctona nel territorio regionale.

La collezione delle orchidee spontanee è un'esperienza di conservazione *ex-situ* ed è presentata nelle aiuole delle "Fasce vegetazionali": pianura, collina e montagna, che ospitano le orchidee in natura. Grazie al continuo sfalcio delle varie aiuole e all'esposizione meridionale favorevole alla sviluppo di queste entità, le orchidee si sono diffuse anche in altre zone del giardino botanico, con individui rigogliosi. Si contano circa 20 specie appartenenti ai generi: *Cephalanthera*, *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *Listera*, *Limodorum*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias* e *Spiranthes*. I luoghi originari di provenienza sono: il Monte Amiata, il Monte Cetona, la Montagnola Senese, le Crete Senesi e la Val d'Orcia, aree legate alle ricerche svolte dal Dipartimento di Scienze della Vita.

La collezione delle orchidee è visibile da marzo a settembre, durante la fioritura a scalare delle varie specie. In primavera, nel

periodo di maggior fioritura, l'osservazione di queste particolari piante offre, con le scolaresche di ogni grado, numerosi spunti per spiegare e discutere i temi dell'evoluzione delle piante terrestri, della riproduzione delle Angiosperme e della simbiosi.

Tra le specie più diffuse nell'Orto botanico troviamo: *Dactylorhiza maculata* (L.) Soò, *Limodorum abortivum* (L.) Sw., *Ophrys bertoloni* Moretti, *Ophrys sphegodes* Mill. (Fig. 1), *Orchis italica* Poir. (Fig. 2), *Orchis simia* Lam., *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

AA.VV., 2010. La conservazione *ex-situ* della biodiversità delle specie vegetali spontanee e coltivate in Italia. ISPRA Manuali e linee guida: 54/2010

Bonini I., Castagnini, P. Perini C., 2010. Museo Botanico. Orto Botanico e *Herbarium Universitatis Senesis*. In: Siena. SIMUS Sistema Museale Universitario Senese. Fondazione Musei Senesi Guide/10 Silvana Editoriale S.p.a

Clauser M., Bedini G., Perini C., Casadio A., 2005. La conservazione *ex-situ* negli Orti botanici universitari della Toscana. Informatore Botanico Italiano 37(1): 128-129

Frignani F., 2011. Atlante delle Orchidee della provincia di Siena. Sistema delle Riserve Naturali della Provincia di Siena. Quaderni Naturalistici 3: 176 pp.

Landi M., Frignani F., Lazzeri C., Angiolini C., 2009. Abundance of orchids on calcareous grassland in relation to community species, enviromental and vegetational conditions. Russian Journal of Ecology 40(7): 486-494.

Maccherini S., Casini S., Perini C., 1999. Le orchidee spontanee della Toscana centro-meridionale all'Orto Botanico di Siena. 94° Congresso S.B.I., Ferrara, 22-25 settembre 1999: 147.

Sgarbi E., Del Prete C., Ronconi L., Dallai D., Perini C., 2001. Wild Italian orchids: from seed to plant experience in a project for *in-situ* reintroduction and *ex-situ* conservation. Planta Europa, the Third European Conference on Plant Conservation (23-28 June 2001) meeting in Pruhonice, Czech Republic.

Fig.1. *Ophrys sphegodes* nell'Orto Botanico di Siena (Foto I. Bonini)

Fig. 2. Fioritura di *Orchis italica* nell'Orto Botanico di Siena (Foto I. Bonini)

Conservazione *ex-situ* di alcune orchidee spontanee piemontesi presso il Centro Biodiversità Vegetale dell'Ente di Gestione del Parco Naturale del Marguareis

Valentina Carasso, Martino Adamo e Bruno Gallino

Centro Biodiversità Vegetale, c/o Ente di gestione del Parco Naturale del Marguareis, Chiusa di Pesio (Cuneo). E-mail:valentina.carasso@virgilio.it; martino.adamo@gmail.com; cbv.parcomarguareis@ruparpiemonte.it

Il programma sperimentale sulla conservazione *ex-situ* delle Orchidee spontanee piemontesi, condotto dal Centro Biodiversità Vegetale (Ente di gestione del Parco Naturale del Marguareis), interessa entità provenienti sia dal comprensorio delle Alpi sudoccidentali che da altre Aree protette del Piemonte. Ad oggi la Banca del germoplasma vegetale del Piemonte (che costituisce uno dei quattro settori in cui è ripartito il Centro) conserva, in forma deidratata, accessioni di 9 specie raccolte nel 2013, fra cui: *Anacamptis coriophora* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh., *Gymnadenia corneliana* (Beauverd) Teppner & E. Klein, *Orchis purpurea* Huds., *Spiranthes aestivalis* (Poir.) Rich. Le finalità di questo primo approccio alle *Orchidaceae* spontanee piemontesi sono duplici: da un lato monitorare la qualità del germoplasma prelevato *in-situ* valutandone lo stato di vitalità sia in condizioni fresche che dopo un periodo in camera di deidratazione; dall'altro indagare in laboratorio le condizioni ambientali ottimali per la sua germinazione mediante propagazione asimbiotica (Van Waes & Debergh, 1986a). La necessità di testare la vitalità dei semi prima di procedere al loro impiego per i test di germinazione o di destinarli alle collezioni della Banca deriva dalla presenza frequente di accessioni costituite da germoplasma non vitale o con un'elevata percentuale di semi vani. Ciò può dipendere sia dallo stadio di maturazione delle capsule e dei semi al momento del prelievo sia da fattori correlati alle condizioni di conservazione successive alla raccolta (Fig. 1). Per tale ragione uno degli aspetti preliminari del nostro programma di conservazione ha interessato l'analisi della vitalità mediante il test chimico al TTC (2,3,5-trifeniltetrazoliocloruro). Tale metodo consente, a seguito di opportuni pre-trattamenti del germoplasma, di verificare lo stato di vitalità degli embrioni, distinguendoli, su base cromatica, tra vitali, parzialmente vitali e non vitali (Fig. 1). È risaputo infatti che molte specie di *Orchidaceae* possiedono tegumenti reticolati (con testa ben sviluppato) che avvolgono l'embrione proteggendolo dagli agenti esterni ed impedendo, di fatto, l'ingresso ai liquidi. Questo aspetto non è di secondaria importanza in quanto può pregiudicare l'efficacia del trattamento al TTC ed impedire il contatto della soluzione chimica con l'embrione (Van Waes & Debergh, 1986b). In questo primo approccio allo studio delle orchidee piemontesi abbiamo sottoposto le entità prelevate nel 2013 alla prova del TTC effettuando un esame sia al momento della raccolta che dopo un periodo di

Fig. 1. Capsule e semi di *Orchis purpurea* dopo la raccolta (*sopra*) e semi di *Epipactis helleborine* (L.) Crantz reattivi dopo la prova al TTC con gli embrioni vitali tinti di rosso (*sotto*) (foto V. Carasso)

deidratazione (15-20°C di temperatura; 15-20% umidità relativa) di circa sei mesi. Parallelamente abbiamo allestito dei test di germinazione scegliendo due entità presenti nel territorio del nostro Parco e i cui semi, dall'analisi di vitalità, risultavano di buona qualità: *Dactylorhiza majalis* e *D. sambucina* (L.) Soó. Per queste specie abbiamo quindi testato l'efficacia di due diversi terreni di coltura: Knudson (1922) e Lindemann *et al*. (1970). Attualmente stiamo monitorando le germinazioni che si sono manifestate sul medium Lindemann e che, dopo 4 mesi, mostrano alcuni embrioni che si stanno progressivamente convertendo in giovani protocormi di forma globulare con e senza rizoidi. L'altro medium di coltura non ha, per il momento, prodotto risultati. Il nostro programma di conservazione delle Orchidee piemontesi procederà sottoponendo anche le altre specie vitali a test di germinazione asimbiotica migliorando di volta in volta i protocolli di rigenerazione.

Il Centro Biodiversità Vegetale si occupa, tra le sue numerose attività, anche della gestione di due collezioni vive situate presso le Stazioni Botaniche Alpine "Burnat/Bicknell" e "Danilo Re", a circa 2000 m di quota, in Alta Valle Pesio. In questo contesto, caratterizzato dalla presenza di circa 500 entità rare, caratteristiche ed endemiche delle Alpi sudoccidentali, si ritrovano anche alcune orchidee spontanee tra cui: *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó subsp. *cruenta* (O.F. Müll.) P.D. Sell, *D. sambucina* (Fig. 2), *D. majalis*, *Chamorchis alpina* (L.) Rich., *Gymnadenia odoratissima* (L.) Rich., *G. corneliana* (Fig. 2), *G. rhellicani* (Teppner & E.Klein) Teppner & E.Klein, *Cypripedium calceolus*, *Traunsteinera globosa* (L.) Rchb. Queste entità, da alcuni anni, sono oggetto di studi relativi alla loro fenologia.

Nei prossimi anni si auspica di poter approfondire le conoscenze inerenti la conservazione di queste *Orchidaceae* al fine di garantirne la sopravvivenza.

Fig. 2. a) *Dactylorhiza sambucina* e b) *Gymnadenia corneliana* nella Stazione Botanica Alpina "Burnat/Biknell"(foto di M. Adamo)

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Knudson L., 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette 73: 1-25.

Lindemann E.G.P., Gunckel J.E., Davidson O.W., 1970. Meristem culture of *Cattleya*. American Orchid Society Bulletin 39: 1002-1004

Royal Botanic Gardens Kew, 2014. Seed Information Database (SID). Version 7.1. Available from: http://data.kew.org/sid/ (April 2014).

Stewart S.L., Kane M.E., 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86:147–158

Van Waes J.M. & Debergh P.C., 1986a. *In vitro* germination of some wetern European orchidds. Physiologia Plantarum 67: 253-261.

Van Waes J.M. & Debergh P.C., 1986b. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability and SEM-study of some western European orchids. Physiologia Plantarum 66: 435-442.

Conservazione *ex situ* di orchidee all'Orto Botanico di Roma

Giuseppe Fabrini ed Elisabetta Aloisi Masella

Orto Botanico di Roma, Università "La Sapienza", Roma. E-mail: giuseppe.fabrini@uniroma1.it

L'Orto Botanico di Roma è una istituzione scientifica e didattica universitaria. Oggi è un Museo del Dipartimento di Biologia Ambientale della Sapienza Università di Roma. La sua sede attuale, nell'area compresa tra il fiume Tevere e le pendici del Gianicolo, nei giardini di Palazzo Corsini, risale al 1883, anno in cui l'intera proprietà della famiglia Corsini fu acquisita dallo Stato. Il palazzo Corsini fu destinato all'attuale Accademia dei Lincei, mentre il giardino del palazzo fu adibito a Orto Botanico universitario. Degli iniziali 16 ettari, 12 vennero ceduti all'Orto Botanico, mentre i restanti 4 furono assegnati e gestiti dal Comune di Roma e destinati alla realizzazione della Passeggiata del Gianicolo. Dopo il 1883 seguì un fortunato periodo storico, con Pietro Romualdo Pirotta primo Direttore, il quale curò il trasferimento delle collezioni già esistenti dalla precedente sede dell'Orto Botanico di via Panisperna, e contribuì al potenziamento delle collezioni con la costruzione di due nuove serre e l'introduzione di molte specie arboree: Palme, Gimnosperme e Angiosperme, molte delle quali ancora viventi. Inoltre, nel 1897, realizzò il primo censimento della storia dell'Orto Botanico.

La funzione primaria che assolve oggi l'Orto Botanico di Roma riguarda, in particolare, le problematiche connesse alla conservazione della biodiversità e alla divulgazione delle conoscenze scientifiche in campo vegetale. Proprio in questa ottica nel 2002 è stata istituita una Banca del Germoplasma. Al momento in questa Banca sono conservate circa 1400 accessioni di semi e spore che corrispondono a circa 1000 entità. Le accessioni si riferiscono alle collezioni dell'Orto Botanico e al germoplasma acquisito in natura (Lazio e Puglia), in particolare di entità a rischio di estinzione. La Banca del Germoplasma dell'Orto Botanico di Roma è socio fondatore della *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione* ex situ *della flora spontanea italiana* (RIBES).

Il Museo ospita attualmente oltre 3000 entità vegetali, molte delle quali di grande pregio per la rarità. La superficie pianeggiante ospita importanti collezioni all'aperto e in serra, tra le quali, di particolare valore: le Palme, il Giardino Mediterraneo, la Serra Corsini che ospita una importante collezione di succulente, la Serra Monumentale che conserva diverse euforbie di grandi dimensioni, il Giardino dei Semplici con le piante officinali e la Serra Tropicale di più recente realizzazione. La parte in pendio si estende fino al Gianicolo e accoglie diverse collezioni, tra le quali: il Roseto, la Valletta delle Felci, il Bambuseto, il Giardino Giapponese, le Piante Australiane, le Gimnosperme con diversi esemplari centenari ed infine il Bosco Romano o Mediterraneo, forse un frammento dell'antica vegetazione esistente a Roma prima dell'urbanizzazione, costituito da un bosco di *Quercus ilex* L., *Quercus robur* L., *Quercus pubescens* Willd. e *Quercus frainetto* Ten.

La collezione delle Orchidee spontanee

La collezione delle Orchidee spontanee, nata negli anni novanta, ha subito negli ultimi decenni diversi spostamenti e vicissitudini. Inizialmente le orchidee erano coltivate lungo il bordo del laghetto, ubicato in prossimità della Serra Corsini (Serra delle Succulente), in seguito furono spostate in una delle due vasche in muratura ("Lettorini"), poste ai due lati della Serra Monumentale. In questo luogo generi come *Orchis*, *Barlia*, *Serapias*, *Anacamptis*, ecc. sono stati coltivati, insieme a corbezzoli e filliree, per diversi anni. Da un censimento effettuato nel 2004 risultavano presenti in questa area 42 *taxa*. Molti di questi, nel giro di pochi anni scomparvero drasticamente. La causa della loro scomparsa è tuttora sconosciuta, forse è da ricercare nella

crescita in dimensioni dei Corbezzoli che oltre all'ombreggiamento potrebbero aver alterato anche le caratteristiche chimico-fisiche del suolo.

Negli ultimi anni, nell'area antistante alla Serra Monumentale, dove si trova il Giardino Mediterraneo dedicato alle flore di tipo mediterraneo, presenti nei diversi continenti, è in attuazione un progetto di conservazione *ex situ* che prevede la coltivazione di orchidee spontanee provenienti da diverse regioni italiane, soprattutto Lazio e Sardegna. All'interno di quest'area sono state realizzate diverse aiuole rialzate in muratura, alte ca. 40 cm, riempite con tre strati sovrapposti di substrato di diversa composizione e granulometria: uno strato basale grossolano di lapillo vulcanico, uno sovrastante sempre di lapillo ma con granuli più piccoli ed infine uno superiore, di maggiori dimensioni, di terriccio universale.

La costruzione di queste aiuole rialzate, riempite con un substrato molto drenante, ha permesso la coltivazione di numerose piante della flora mediterranea che mal sopportano terreni asfittici. Una di queste aiuole, storicamente utilizzata per la coltura di Euforbie spontanee italiane, è stata destinata alle orchidee spontanee (Fig. 1). Oggi sono presenti in questa aiuola 20 entità che sembrano convivere perfettamente con diversi individui di *Euphorbia characias* L., *Euphorbia myrsinites* L. e *Euphorbia pinea* L.: *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter, *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soó *s.l.*, *Ophrys bombyliflora* Link, *O. fusca* Link subsp. *iricolor* (Desf.) K. Richter, *O. holosericea* (Burm. f.) Greuter subsp. *apulica* (O. Danesch & E. Danesch) Buttler, *O. lutea* Cav. subsp. *minor* (Tod.) O. Danesch & E. Danesch, *O. promontorii* O. Danesch & E. Danesch, *O. speculum* Link, *O. sphegodes* Mill., *O. exaltata* Ten. subsp. *tyrrhena* (Gölz & H.R.Reinhard) Del Prete, *Orchis italica* Poir., *O. longicornu* Poir., *O. morio* L., *O. morio* L. f. *alba*, *O. papilionacea* L., *O. x gennarii* Reich. fil., *Serapias cordigera* L., *S. lingua* L., *S. parviflora* Parl., *S. vomeracea* (Burm. f.) Briq. Gli esemplari coltivati producono fiori e frutti tutti gli anni e nel caso di *Barlia robertiana* (Fig. 2) è nato spontaneamente un individuo che ora fiorisce e fruttifica regolarmente.

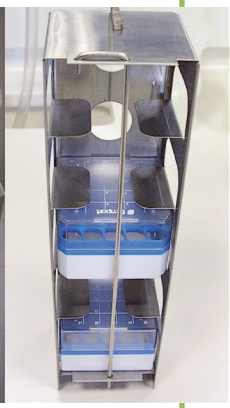
Fig. 2. *Barlia robertiana* (foto G.Fabrini)

Fig. 1. Aiuola dedicata alla collezione delle orchidee spontanee (foto G. Fabrini)

Il progetto “CrioBanca del Germoplasma dell’Università di Modena e Reggio Emilia”

Elisabetta Sgarbi ed Andrea Pirondini

Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze della Vita, Reggio Emilia.
E-mail: elisabetta.sgarbi@unimore.it



La crioconservazione, ovvero lo stoccaggio in azoto liquido, è una tecnica innovativa di derivazione biotecnologica che sempre più sta trovando applicazioni operative anche nel campo della conservazione del germoplasma delle orchidee. Il metodo criogenico consiste nel portare il materiale biologico alla temperatura di -196 °C. A questa temperatura ultra bassa tutti i processi metabolici cessano e, teoricamente, le cellule vegetali possono rimanere per un tempo indeterminato senza subire modificazioni o alterazioni (Lambardi & De Carlo, 2009). L'azoto liquido è stato utilizzato con successo da Pritchard (1984) per conservare nel lungo periodo semi di orchidee già a partire dal 1984. Con l’applicazione di opportuni crioprotettori è possibile crioconservare anche protocormi e/o gemme.

L’allestimento della criobanca realizzata nell’ambito del progetto “CrioBanca del Germoplasma dell’Università di Modena e Reggio Emilia”, finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Reggio Emilia “Pietro Manodori”, ha come principali finalità:

- Messa a punto di protocolli specifici per la crioprotezione e la crioconservazione dei genotipi di interesse locale e nazionale.
- Verifica della vitalità e dell'integrità del materiale conservato con test di vitalità, prove di germinazione *in vitro* e di micropropagazione.
- Definizione di protocolli per l'acclimatazione e la reintroduzione *in situ* del materiale micropropagato.

Il comportamento dei semi di orchidea è considerato "ortodosso", il che significa che possono tollerare il trattamento di disidratazione ed il congelamento a -20 °C, condizioni comunemente applicate nelle tradizionali banche dei semi. La crioconservazione si propone come tecnica complementare e alternativa, indispensabile per alcune specie di orchidee “*short-lived*” che hanno mostrato una veloce perdita di vitalità nel breve termine. La vitalità e l’integrità del materiale stoccato nella *CryoBank* sono valutate periodicamente con prove di germinazione *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

Pritchard H.W., 1984. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. CryoLetters 5: 295-300.

Lambardi M., De Carlo A., 2009. Tecniche ed applicazioni della criogenia alla conservazione ed al risanamento di germoplasma vegetale. Italus Hortus 16: 79-98.

OSSSU: una rete internazionale per la conservazione dei semi delle orchidee

Philip T. Seaton, Hugh W. Pritchard e Timothy R. Marks

Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, West Sussex, UK. E-mail: P.Seaton@kew.org

Il ritmo allarmante con cui molti habitat sono soggetti a degrado, la continua raccolta di esemplari ed i cambiamenti climatici in atto stanno producendo effetti misurabili su alcune popolazioni di orchidee, suggerendo quanto sia ormai urgente intervenire con determinazione per contrastare il fenomeno. La conservazione *ex situ*, in generale, è stata applicata con successo nella protezione e reintroduzione di molte specie, ma in particolare la conservazione di semi di orchidee in condizioni controllate fornisce una garanzia a lungo termine contro l'imminente perdita di specie nei loro habitat naturali. Per sviluppare questa idea, nel 2007 è stata lanciata una iniziativa, promossa dal *Royal Botanic Gardens* di Kew, dal titolo "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use (OSSSU)*", un progetto "*Darwin Initiative*" di tre anni (http:// darwin.defra.gov.uk/), finanziato dal Dipartimento britannico per l'ambiente e gli affari rurali. Grazie a workshop tenutisi a Chengdu, in Cina, e presso il *Jardín Botánico de Quito*, Ecuador, nell'autunno del 2007, seguiti da un workshop riassuntivo tenutosi nel settembre 2010 presso il *Jardín Botánico Lankester* in Costa Rica (Fig. 1 - nell'intestazione - foto N. Neto), il progetto ha riunito istituzioni interessate a sviluppare la loro capacità di conservare semi di orchidee basandosi sull'esperienza maturata dalla *Millennium Seed Bank* di Kew e da altri biologi di tutto il mondo che si occupano di semi di orchidee (Seaton & Pritchard, 2008). Inizialmente il network rappresentava circa 15 paesi in Asia ed America Latina, rappresentanti di regioni con una elevata diversità di orchidee. I partecipanti al network sono poi aumentati, includendo istituti europei, e, speriamo, anche dall'Africa. Attualmente alla rete partecipano 27 paesi.

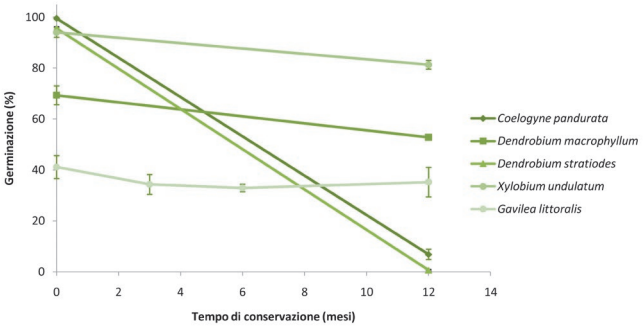
Scopo del progetto era di creare una rete globale di banche di semi di orchidee che utilizzassero protocolli comuni per la deidratazione e la conservazione dei semi e conducessero test di germinazione volti a misurare sia la capacità germinativa iniziale del seme che le sue variazioni nel tempo. I dati ottenuti da questo lavoro sono stati resi disponibili ai partecipanti attraverso una sezione, protetta da password, del sito web di OSSSU (www.osssu.org). Per i primi 15 paesi partecipanti è stato fissato un target di 20 specie per paese (300 specie in totale): un obiettivo apparentemente modesto derivato dalla mole di lavoro richiesto per condurre regolarmente test di germinazione su due differenti terreni di coltura e dal tempo necessario per eseguire impollinazioni controllate ed una corretta raccolta dei semi. In occasione dei primi workshop si è convenuto di condurre test di germinazione sul terreno Knudson C (Knudson, 1946), ampiamente utilizzato e largamente disponibile, contenente nutrienti minerali con l'aggiunta di saccarosio. Questo avrebbe fornito, per la prima volta, dati di germinazione asimbiotica confrontabili, condotti nelle stesse condizioni per un'ampia gamma di specie, di paesi e di habitat. Inoltre, per avere un confronto, doveva essere utilizzato anche il "miglior" terreno di coltura disponibile nei laboratori dei partecipanti (per es. il terreno che può dare la più alta percentuale di germinazione per determinate specie). L'obiettivo iniziale di 300 specie è stato largamente superato alla fine del periodo di tre anni, e il numero di accessioni di semi conservati continua ad aumentare parallelamente all'espansione della rete, con l'inclusione di un numero sempre maggiore di paesi ed istituti.

Fig. 2. Esempi di formazione OSSSU di studenti in Ecuador (a sinistra) e di impollinazione di *Cattleya quadricolor* in Colombia (a destra) (foto P. Seaton)

Il successo della raccolta dei semi dipende dalla loro qualità che deve essere ottimale per garantirne la longevità e, naturalmente, dalla corretta identificazione della specie da cui il campione è prelevato. Per assicurare una corretta identificazione e raccolta dati, quando possibile, dei saggi d'erbario sono stati depositati nei giardini botanici oppure, al limite, sono state scattate fotografie di buona qualità di fiori e piante intere. I semi sono stati raccolti da capsule mature e sono state definite di buona qualità le accessioni con un'alta percentuale di semi con embrioni ben formati ed esenti da contaminazioni batteriche e fungine. La loro vitalità iniziale, misurata con coloranti vitali come tri-fenilcloruro di tetrazolio o diacetato di fluoresceina, dovrebbe essere alta così come il livello di germinazione. Sebbene siano state effettuate raccolte di semi in natura, dove non erano disponibili piante in coltura (in Cile per esempio), per ragioni pratiche (la raccolta in natura può infatti essere costosa e richiedere molto tempo) la maggior parte delle raccolte è stata fatta da piante in collezione ed impollinate artificialmente. Quando possibile, l'impollinazione incrociata è preferibile, in quanto evita i problemi di auto-incompatibilità che possono verificarsi in alcuni generi (ad esempio *Oncidium* e *Restrepia*) ed inoltre assicura la massima variabilità genetica all'interno di una specie. L'impollinazione dei fiori delle orchidee può essere complicata, così è essenziale la formazione del personale e degli studenti sulla struttura fiorale delle orchidee.

Nel proporre il progetto iniziale, è stato evidenziato come la formazione del personale e degli studenti fosse determinante per il raggiungimento dei risultati desiderati, ma anche per assicurare continuità al progetto al di là del periodo di finanziamento iniziale. Dove possibile, sono state formate due persone per ogni istituto partecipante, per minimizzare il rischio della perdita di competenze per non prevedibili *turnover* del personale. Era previsto che le competenze venissero trasmesse ad altri membri di ciascun istituto, in particolare gli studenti, attraverso una formazione a cascata e mediante corsi di formazione interni ai diversi istituti. Per esempio, numerosi workshop per studenti si sono tenuti presso il *Jardín Botánico Quito* (Fig. 2) e la *Mahidol University* in Thailandia. Studenti tailandesi della *Mahidol University* sono stati mandati alla *Millennium Seed Bank* di Kew per la formazione, e allo stesso scopo studenti della *Universidade Federal do Paraná* (UFPR) in Brasile si sono recati all'*Atlanta Botanical Garden*. Vari workshop tra membri dei paesi partecipanti al progetto si sono tenuti a Shenzhen, in Cina (aprile 2012), e al *Jardín Botánico Orquideario Soroa* a Cuba (ottobre 2012), per stimolare la creazione di più reti locali o regionali

Fig. 3. Cambiamenti nella vitalità dipendenti dalle specie espressi come percentuale di geminazione dopo la conservazione dei semi a T =-20°C. Modificato da Seaton et al (2013)



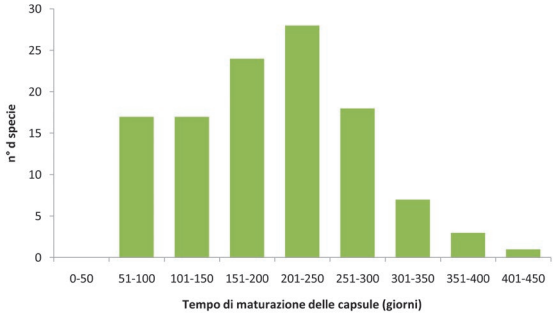


Fig. 4. Tempo di maturazione delle capsule di 115 specie raccolte in 4 Paesi: Brasile, Indonesia, Singapore, Tailandia

e la collaborazione tra gruppi locali che potrebbe facilitare lo scambio di materiale (Seaton *et al*., 2013).

I principali obiettivi del progetto OSSSU sono stati la promozione della conservazione dei semi di orchidee e la comparazione della germinazione tra specie. Questo ha evidenziato considerevoli differenze nella longevità dei semi tra le specie, sottolineando la necessità di uno scambio di informazioni a livello internazionale (Fig. 3). Inoltre, i diversi processi per la produzione dei semi hanno consentito di registrare altri dati, quali i tempi di apertura delle capsule che possono variare notevolmente tra specie (Fig. 4) e il numero di semi prodotti per capsula. Documentare la fenologia delle specie, spesso per la prima volta, è di supporto per la definizione di strategie di raccolta idonee per le specie naturali e garantisce la raccolta solo di semi completamente maturi, quindi fisiologicamente idonei per la conservazione a lungo termine. I semi germogliati derivanti da questo lavoro oltre ad essere preziosi di per sé, sono stati usati per integrare collezioni *in vivo* (Fig. 5), che possono essere utilizzate per la ricerca o l'orticoltura e per programmi di reintroduzione. Ad esempio, i partecipanti al progetto sono stati coinvolti nella reintroduzione di *Cattleya quadricolor* Lindl. in Colombia, *Cyrtopodium punctatum* (L.) Lindl. in Florida e di numerose specie, tra cui *Grammatophyllum speciosum* Blume a Singapore (Tim Wing, 2013) e *Oncidium excavatum* Lindl. in Ecuador. Comunicazione e formazione tempestive, regolari ed efficaci sono la chiave per il prolungato successo di network come OSSSU dove è necessario fare buon uso di una varietà di approcci, come workshop o media, adattandoli alle esigenze dei diversi partecipanti. Una descrizione delle tecniche consigliate è stata diffusa tra i partecipanti al progetto grazie alla distribuzione del libro "*Growing Orchids from Seed*" (Seaton & Ramsay, 2005), e la sua successiva pubblicazione in spagnolo (Seaton *et al*., 2009), finanziata da OSSSU, ha reso più facilmente disponibili le tecniche anche agli orchidologi dell'America Latina. Il volume dovrebbe essere pubblicato anche in cinese nel 2014, sotto gli auspici del *Kunming Institute of Botany* (*Chinese Academy of Sciences*). In aggiunta, il sito web di OSSSU fornisce informazioni sui protocolli utilizzati e sulle attività in corso.

Il nome del progetto dovrà essere modificato in "*Orchid Seed Science and Sustainable Use*" (pur mantenendo le stesse iniziali) per riflettere meglio i suoi obiettivi futuri focalizzati sulla biologia dei semi delle orchidee. Il lavoro che si sta svolgendo presso la *Universidade do Oeste Paulista* (UNOESTE) in Brasile illustra bene il tipo di attività svolta dai partners di OSSSU. L'insegnamento è un aspetto chiave della conservazione dei semi di orchidee in UNOESTE. Agli studenti vengono insegnate la biologia del fiore e le tecniche di impollinazione sia per orchidee a fiori grandi, come *Cattleya*, che a fiori piccoli, come *Pleurothallis*, insieme alla biologia del seme ed ai protocolli di conservazione e germinazione. Sono state sviluppate tecniche che vedono l'uso del colorante *tetrazolium* per determinare la vitalità dei semi e per catturare immagini con una fotocamera digitale che consentano una registrazione permanente delle osservazioni richieste (Hosomi *et al*., 2011, 2012). Anche se molte delle specie oggetto di studio risultano minacciate (*IUCN Red List* o Appendice I CITES), lo stato di conservazione di altre non è ancora noto. Pertanto le plantule ottenute dalle prove di germinazione sono coltivate fino a diventare piante adulte; alcune sono ormai in piena fioritura e sono state reintrodotte nel loro habitat naturale oppure cedute a collezionisti. Fornire piante coltivate agli appassionati riduce così la pressione di raccolta sulle popolazioni naturali.

Ad oggi pochi lavori sono stati condotti sulla conservazione del polline delle orchidee, ma

dati raccolti dalla *Millennium Seed Bank* indicano come il polline abbia longevità simile ai semi, possa essere conservato per diversi anni ed utilizzato con successo per produrre nuovi semi, se deidratato fino a un contenuto di umidità idoneo e conservato a-20°C, sebbene sia possibile anche a-196°C (Pritchard & Prendergast, 1989). Ciò apre alla possibilità di collaborazioni tra istituti che ospitano collezioni vive sia nello stesso paese che tra paesi diversi, con scambi di polline che potrebbero garantire il mantenimento della diversità genetica all'interno delle popolazioni e consentire l'impollinazione di specie esotiche anche fuori stagione.

In pratica, perché le attività di conservazione possano avere successo in futuro è necessario sviluppare programmi didattici e coinvolgere la partecipazione di un numero maggiore di *stakeholder* con una vasta gamma di esperienze e competenze, disposti a lavorare sui vari aspetti della conservazione delle orchidee in quello che sta diventando noto come "*Citizen Science*". Nel Regno Unito questo processo, grazie al progetto *National Collections* (organizzato dall'organizzazione benefica "*Plant Heritage*"), si è avviato per diversi generi di orchidee con coltivatori amatoriali specializzati che stanno seguendo i protocolli di OSSSU. Analogamente, c'è la forte necessità di attrarre studenti che, già in tenera età, siano coinvolti in progetti analoghi nelle scuole. Così a Cuba e nella Repubblica Dominicana sono stati avviati programmi di sensibilizzazione nelle scuole, e le scuole *King Charles 1st School* e *Writhlington School* in Gran Bretagna hanno dotato di risorse laboratori dedicati alle orchidee per formare ed appassionare le generazioni più giovani sulla conservazione delle orchidee.

Fig. 5. Esempi di collezioni *in vivo* di orchidee coltivate in serre ombreggiate in Cina (a sinistra) e in Colombia (a destra)

BIBLIOGRAFIA

Hosomi S.T., Santos R.B., Custodio C.C., Seaton P.T., Marks T.R., Machado-Neto N.B., 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. Seed Science and Technology 39: 178-189.

Hosomi S.T., Santos R.B., Custodio C.C., Seaton P.T., Marks T.R., Machado-Neto N.B., 2012. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (*Orchidaceae*) seeds following storage. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. Plant 48: 127-136.

Knudson L., 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. American Orchid Society Bulletin 15: 214-217.

Pritchard H.W., Prendergast F.G., 1989. Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen. In: Pritchard H.W. (ed.), Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management: 1-16. Cambridge Univ. Press, UK.

Seaton P.T., Kendon J.P., Pritchard H.W., Puspitaningtyas D.M., Marks T.R., 2013. Orchid conservation: the next ten years. Lakasteriana 13: 93-101.

Seaton P.T., Pritchard H.W., 2008. Life in the freezer. Orchids 76: 762-773.

Seaton P., Ramsay M., 2005. Growing Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens Kew, 82 pp.

Seaton P., Ramsay M., Warner J., 2009. Cultivo de orquídeas por semillas. Royal Botanic Gardens Kew

Tim Wing Y., 2013. Native Orchids of Singapore: Diversity, Identification and Conservation. ISBN-978-981-07-8078-4, 122pp.

La collezione di orchidee spontanee all'Orto Botanico della Tuscia

Enrico Scarici[1], Monica Fonck[1], Sergio Buono[2], Massimiliano Rempicci[2], Emanuele Gransinigh[2], Giorgio Chioccia[1], Laura Zucconi[3] e Sara Magrini[4]

[1]*Orto Botanico della Tuscia, Università della Tuscia, Viterbo. E-mail: scarici@unitus.it, fonck@unitus.it;* [2]*GIROS Sezione "Etruria Meridionale";* [3]*Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo. E-mail: zucconi@unitus.it;* [4]*Banca del Germoplasma della Tuscia, Università della Tuscia, Viterbo. E-mail: magrini@unitus.it.*

L'Orto Botanico e la Banca del Germoplasma della Tuscia, in collaborazione con la sezione "Etruria meridionale" dell'associazione GIROS (Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee), hanno avviato da alcuni anni numerose iniziative finalizzate alla conoscenza e conservazione *ex situ* di orchidee spontanee provenienti dal territorio italiano. In questo contesto, la prima azione ha riguardato la costituzione di una collezione di orchidee terrestri a scopo didattico e divulgativo presso l'Orto Botanico.

Fig. 1. a) Piante di *Anacamptis morio* pronte per il trapianto in campo e b) fioritura di *Orchis italica* nella collezione all'Orto Botanico della Tuscia (foto E. Scarici)

Fig. 2. *Cephalanthera longifolia* con cartellino identificativo (foto S. Magrini)

Allestita a partire dal 2004, la collezione è stata ampliata negli anni, anche grazie al progetto "Conservazione *ex situ* delle orchidee spontanee: didattica e divulgazione" (finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca) e attualmente ospita 23 specie appartenenti a 8 generi. Ogni *taxon* è provvisto di cartellino recante il binomio scientifico e l'areale di distribuzione. In prossimità della zona di conservazione è stato posizionato un pannello informativo che riporta l'elenco delle specie presenti e una fotografia di ciascuno di essi con l'indicazione della provenienza degli esemplari (Fonck *et al*., 2007; Magrini *et al*., 2014).

La collezione occupa una superficie di circa 25 m^2 ed è collocata tra l'area del bosco di caducifoglie, in cui in parte è inclusa, e l'adiacente scarpatella inerbita con affioramento di travertino, al limitare del Palmeto. Le diverse condizioni ecologiche hanno consentito la coltivazione sia di specie legate alle praterie su suolo calcareo, come *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *A. papilionacea* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, *A. morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (Fig. 1a), *Orchis italica* Poir. (Fig. 1b), *O. simia* Lam., *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq., *Serapias lingua* L., *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., *Ophrys bombyliflora* Link, *O. fusca* Link subsp. *funerea* (Viv.) Arcang., *O. lutea* Cav. subsp. *minor* (Guss.) O. Danesch & E. Danesch, *O. tenthredinifera* Willd., sia di specie nemorali quali *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó, *D. romana* (Sebast.) Soó subsp. *romana*, *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch (Fig. 2), *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb., *Orchis mascula* L. e *O. purpurea* Huds. Inoltre, alcune specie sono presenti naturalmente all'interno dell'Orto Botanico, quali *Ophrys sphegodes* Miller subsp. *passionis* (Sennen) Sanz & Nuet (= *O. garganica* O. Danesch & E. Danesch) particolarmente abbondante in diversi settori, *O. bertolonii* Moretti subsp. *bertolonii* ed il loro ibrido *O.* ×*grottagliensis* P. & C. Delforge (Fig. 3). Uno specifico ambiente umido di coltivazione è stato predisposto, infine, per ospitare alcuni esemplari di *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase e *A. laxiflora* (Lam.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase.

Degna di nota per il particolare interesse conservazionistico e biogeografico è la presenza in collezione di *Anacamptis palustris* (= *Orchis palustris* Jacq.) e dell'ibrido spontaneo *Ophrys* ×*grottagliensis*.

Anacamptis palustris è specie euro-mediterranea diffusa nel Mediterraneo occidentale e nel Nord e Centro Europa (Arduino *et al*., 1996), "Minacciata" (EN) a livello nazionale (Rossi *et al*., 2013), "Gravemente minacciata" (CR) nel Lazio (Conti *et al*., 1997) e a rischio di estinzione anche in altri Paesi europei (Schnittler *et al*., 2001). Cresce in ambienti palustri, in particolare, in aree retrodunali lungo le coste, ad eccezione delle rare popolazioni dell'Italia centrale che vivono in ambienti altamente salini, come le sorgenti sulfuree (Cozzolino *et al.*, 2003a,b). L'entità è presente in diverse regioni italiane ma con grandi popolazioni solo in Emilia Romagna e Puglia, mentre altrove risulta rara, localizzata e in graduale regressione, principalmente a causa dell'alterazione dell'habitat, tanto che risulta estinta, ormai, in Liguria, Lombardia, Marche, Calabria e Sicilia (Scoppola & Spampinato, 2005). Il pericolo di estinzione della specie in Italia appare grave anche in considerazione della bassa variabilità genetica riscontrata entro e tra le popolazioni (Arduino *et al*., 1996).

Nel Viterbese cresce unicamente nella zona umida del Bagnaccio (piana di Viterbo, 300 m s.l.m.), dove è presente una sorgente idrotermale calda che alimenta una zona acquitrinosa di elevato interesse floristico (Picarella, 1993). Negli ultimi anni il numero degli esemplari di *A.*

palustris si è ridotto sensibilmente a causa del convogliamento delle acque sorgive all'interno di vasche di balneazione, pertanto, la popolazione rischia di scomparire (Magrini *et al*., 2011). In attesa dell'adozione di specifici interventi di conservazione *in situ*, negli anni 2006/2010 è stata effettuata la raccolta di semi, attualmente conservati presso la Banca del Germoplasma della Tuscia, mentre alcuni esemplari sono conservati *in vivo* presso l'Orto Botanico (Fonck *et al*., 2007).

Ophrys ×*grottagliensis* (*O. sphegodes* subsp. *passionis* x *O. bertolonii*) è un'entità ibrida estremamente rara rinvenuta in anni recenti nell'Orto Botanico, all'interno di una vasta popolazione spontanea di *O. sphegodes* subsp. *passionis*, una delle sue specie parentali (Buono *et al*., 2013). Il ritrovamento assume un particolare interesse anche in considerazione del fatto che le specie parentali presentano fenologia diversa nell'Italia centrale, pertanto è limitata la possibilità che si verifichino periodi di sovrapposizione delle fioriture, inoltre, le stesse sarebbero impollinate da generi di api diversi (Claessens & Kleynen, 2011). Questa popolazione è tuttora oggetto di uno studio morfometrico, demografico e sulla capacità riproduttiva (Fig. 4). In base al numero degli esemplari presenti, attualmente circa 60, quella dell'Orto Botanico della Tuscia è da ritenersi probabilmente la più grande popolazione di *O.* ×*grottagliensis* conosciuta in tutta la sua area di distribuzione, che è limitata solo a pochissime località dell'Italia centro-meridionale (Buono *et al*., 2013).

Fig. 3. *Ophrys* ×*grottagliensis* all'Orto Botanico della Tuscia (foto S. Buono)

BIBLIOGRAFIA

Arduino P., Verra F., Cianchi R., Rossi W., Corrias B., Bullini L., 1996. Genetic variation and natural hybridization between *Orchis laxiflora* and *Orchis palustris* (Orchidaceae). Plant Systematics & Evolution 202: 87-109.

Buono S., Rempicci M., Gransinigh E., Grassetti N., Chicote X., Haile G., Fonck M., Onofri S., Magrini S., 2013. *Ophrys* ×*grottagliensis* P. & C. Delforge (*Ophrys bertolonii* subsp. *bertolonii* x *Ophrys garganica*), a new hybrid population in central Italy. Journal Europäischer Orchideen 45(1): 25-30.

Claessens J., Kleynen J., 2011. The Flower of the European Orchid: Form and Function. Schrijen-Lippertz, Stein, Netherlands.

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle piante d'Italia. WWF, Società Botanica Italiana.

Cozzolino S., Cafasso D., Pellegrino G., Musacchio A., Widmer A., 2003a. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. Molecular Ecology 12: 2783-2792.

Cozzolino S., Noce M.E., Musacchio A., Widmer A., 2003b. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*). American Journal of Botany 90: 1681-1687.

Fonck M., Magrini S., Scoppola A., Onofri S., 2007. Conservazione *ex situ* di orchidee spontanee

Fig. 4. Studio della popolazione di *Ophrys xgrottagliensis*: in primo piano E. Gransinigh e S. Buono (GIROS Sez. "Etruria Meridionale") intenti a fotografare l'ibrido; sullo sfondo alcuni studenti stanno raccogliendo dati morfometrici nell'ambito di una tesi di laurea (Grassetti, 2013) (foto S. Magrini)

all'Orto Botanico della Tuscia. Sicilia Foreste 34(suppl.): 350.
Grassetti N, 2013. *Ophrys xgrottagliensis*, una nuova popolazione ibrida nel centro Italia. Una nuova specie? Tesi di Laurea in Scienze Ambientali. Rel.: S. Onofri; Correl.: S. Magrini
Magrini S., Buono S., De Vitis M., Haile G., Rempicci M., Gransinigh E., Scarici E., Fonck M., 2014. Conservation of endemics, rare and threatened Italian orchids in Botanical Garden and Tuscia Germplasm Bank (Viterbo, Central Italy). Journal Europäischer Orchideen 46(1): 103-114.
Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A., 2011. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*. European Journal of Environmental Sciences 1(2): 71-79.
Picarella E.M., 1993. Contributo alla conoscenza floristica di un ambiente umido nella campagna viterbese in località Bagnaccio (Italia centrale). Annali di Botanica (Roma) 49(suppl. 8) (1991): 59-82.
Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S. (Eds.), 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.
Schnittler M., Köppel C., Rennwald E., Hirneisen N., 2001. European National Red Lists of Threatened Vascular Plants. Project report and description of the corresponding database. Third stage. Council of Europe, Strasbourg, France.
Scoppola A., Spampinato G. (Eds.), 2005. Atlante delle specie a rischio di estinzione. Versione 1.0. CD-Rom, Palombi Editore, Roma.

Conservazione delle orchidee nella Banca del Germoplasma della Tuscia

Sara Magrini[1], Sergio Buono[2], Marcello De Vitis[1], Genet Haile[1], Massimiliano Rempicci[2], Emanuele Gransinigh[2] e Laura Zucconi[3]

[1]Banca del Germoplasma della Tuscia, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo. E-mail: magrini@unitus.it; [2]GIROS (Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee) Sezione "Etruria meridionale" Oriolo Romano (Viterbo). E-mail: sergood@libero.it; [3]Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo. E-mail: zucconi @unitus.it

Dal 2008 la maggior parte delle ricerche e della attività della Banca del Germoplasma della Tuscia (BGT), socio fondatore della *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione* ex situ *della flora spontanea italiana* (RIBES), si è concentrata sulle orchidee spontanee, con particolare riferimento alla loro conservazione *in situ* ed *ex situ* (Magrini *et al*., 2014).

Grazie alla collaborazione con la sezione "Etruria Meridionale" di GIROS (Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee) per tutte le attività sul campo, come individuazione e monitoraggio delle popolazioni e raccolta di semi maturi (Magrini *et al*., 2013c), attualmente la BGT conserva *ex situ* 168 accessioni di semi di 61 *taxa* appartenenti a 17 generi, conservando quindi il germoplasma di circa il 30% delle entità italiane della famiglia *Orchidaceae* e di più della metà (59%) dei suoi generi (GIROS, 2009). I generi con il maggior numero di *taxa* e di accessioni sono: *Ophrys* (15 entità e 30 accessioni), *Anacamptis* (9 entità e 36 accessioni), *Orchis* (8 entità e 15 accessioni) ed *Epipactis* (5 entità e 17 accessioni). Le altre specie conservate appartengono ai generi *Dactylorhiza*, *Serapias*, *Limodorum*, *Neotinea*, *Cephalanthera*, *Spiranthes*, *Himantoglossum*, *Neottia*, *Platanthera*, *Listera*, *Epipogium*, *Cypripedium* e *Barlia* (Fig. 1).

Per la conservazione dei semi vengono applicati i protocolli di *OSSSU, Orchid Seed Stores for Sustainable Use* (http://osssu.org), un progetto internazionale coordinato dal *Royal Botanic Gardens*, Kew (UK) (Seaton & Pritchard, 2008; Seaton *et al*., 2010) (Fig. 2).

Per assicurare una efficiente conservazione a lungo termine, stiamo testando gli effetti della deidratazione e del

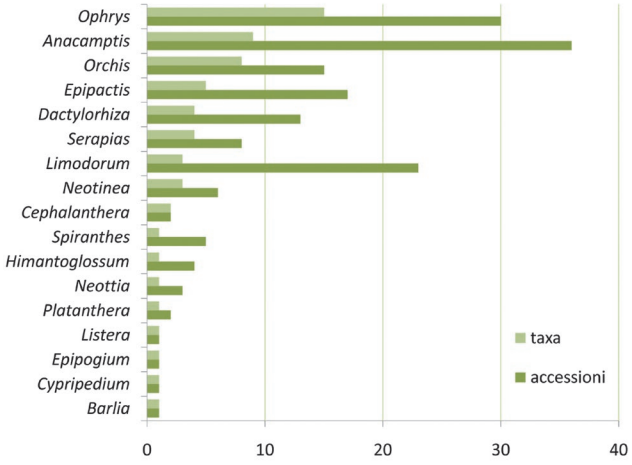


Fig. 1. Generi conservati nella Banca del Germoplasma, con indicazione del numero di *taxa* e di accessioni

Fig. 2. Semi di *Limodorum trabutianum* deidratati secondo il protocollo di OSSSU e pronti per la conservazione a lungo termine (foto S. Magrini)

congelamento (T =-20°C) sulla vitalità dei semi e sulla loro capacità germinativa in 16 specie appartenenti ai generi *Anacamptis* (Magrini *et al*., 2013a), *Dactylorhiza*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Ophrys* e *Spiranthes*.

Una parte dei semi raccolti viene utilizzata per condurre test di vitalità e di germinazione asimbiotica *in vitro*, ma anche per la riproduzione *in vitro* delle specie da conservare (Fig. 3), un metodo utile per produrre protocormi e plantule per la conservazione *in vitro* (Fay, 1992), per lo studio della biologia riproduttiva e per eventuali reintroduzioni in natura, dando così maggior valore alle attività di raccolta e conservazione del germoplasma (Seaton & Pritchard 2003; Swarts & Dixon 2009; Magrini *et al*., 2011b). Sono stati quindi intrapresi vari studi per valutare il successo riproduttivo di specie dei generi *Anacamptis*, *Limodorum*, *Ophrys* e *Dactylorhiza*, sia *in situ* (tramite studio del *fruit-set*) che *ex situ* (valutazione della capacità germinativa e di sviluppo *in vitro*). Parallelamente vengono condotti studi sugli effetti di diversi terreni di coltura, della fonte di azoto (organico o inorganico), dei metodi di scarificazione e del livello di maturazione dei semi (Fig. 4) sulla germinazione e sullo sviluppo dei protocormi (Magrini *et al*., 2011b, 2012a, 2013b).

Fra le specie conservate e oggetto di specifiche ricerche sono presenti alcune orchidee rare o minacciate come *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (Magrini *et al*., 2011b, 2012a), *Epipactis placentina* Bongiorni & Grünanger (Magrini *et al*., 2012b,c), *Cypripedium calceolus* L., *Limodorum trabutianum* Batt. (Magrini *et al*., 2011a), *Ophrys lutea* Cav. subsp. *minor* (Guss.) O. Danesch & E. Danesch (Buono *et al*., 2011) (Fig. 5); alcune delle cosiddette "*policy species*" (specie elencate negli allegati della Direttiva Habitat o della Convenzione di Berna) come *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann e *Orchis provincialis* Balb. ex Lam. & DC., oltre ad alcune specie endemiche, come *Limodorum brulloi* Bartolo & Pulv., *Ophrys argentaria* Devillers-Tersch. & Devillers, *O. exaltata* Ten. subsp. *montis-leonis* (O. Danesch & E. Danesch) Soca, *O. sphegodes* Mill. subsp. *passionis* (Sennen) Sanz & Nuet (= *O. garganica* O. Danesch & E. Danesch), *O. sphegodes* Mill. subsp. *majellensis* Helga & Herm. Daiss, *O. sphegodes* Mill. subsp. *tarquinia* (P. Delforge) Kreutz. Recentemente sono iniziate le raccolte anche di semi di ibridi naturali tra cui *Anacamptis* x*gennarii* (Rchb. f.) H. Kretzschmar, Eccarius & H. Dietr. e *Ophrys* x*grottagliensis* P. & C. Delforge per studiarne la capacità germinativa (Buono *et al*., 2013).

Attualmente sono in corso vari progetti di conservazione, fra cui:

- "*OSSSU, Orchid Seed Stores for Sustainable Use*" (http://osssu.org), progetto internazionale per

Fig. 3. Plantule di *Anacamptis papilionacea* e *A. laxiflora* riprodotte *in vitro* (foto S. Magrini)

Fig. 4. Capsula verde di *Anacamptis palustris* con semi immaturi all'interno (foto S. Magrini)

la conservazione *ex situ* di semi di orchidee spontanee coordinato dal *Royal Botanic Gardens*, Kew (UK) (Seaton *et al*., 2010).

- "*Proposta di azioni per la conservazione* in situ *della popolazione di* Limodorum trabutianum *all'interno del Parco Regionale* Marturanum", in collaborazione con la Sezione "Etruria Meridionale" di GIROS e con il Parco *Marturanum* (Barbarano Romano, Viterbo). Tale progetto ha previsto interventi *in situ*, come l'installazione di recinzioni per proteggere la piccola popolazione di *L. trabutianum* dai danni causati da cinghiali e dal pascolo brado di bovini ed equini, e varie ricerche con l'obiettivo di conoscere al meglio la biologia ed ecologia di questa orchidea a rischio di estinzione: dal 2011 vengono portati avanti lo studio demografico, il monitoraggio fenologico e lo studio della capacità riproduttiva (*fruit-set* e capacità germinativa *in vitro*) (Magrini *et al*., 2011a, 2012b) oltre ad uno studio comparato della micromorfologia dei semi di *L. trabutianum* e *L. abortivum* (L.) Sw. che si sono dimostrati un utile carattere diagnostico per distinguere le due specie durante la fruttificazione (Magrini *et al*., 2010).
- "*Conservazione* ex situ *di orchidee spontanee: didattica e divulgazione*", Progetto Annuale MIUR per la Diffusione della Cultura Scientifica (Legge 6/2000), in collaborazione con l'Orto Botanico della Tuscia: è un progetto integrato che ha previsto attività di conservazione *ex situ*, attività formative e azioni di divulgazione e sensibilizzazione e che si è concluso con la pubblicazione del presente volume.
- "*Conservazione delle orchidee delle Oasi WWF*", progetto appena partito (maggio 2014) che prevede la formazione del personale delle Oasi per il monitoraggio delle popolazioni di alcune specie di particolare valore e per la raccolta dei semi per la conservazione *ex situ*. Il primo anno di progetto sarà focalizzato su specie di ambienti umidi, in particolar modo *Anacamptis palustris*, *Epipactis palustris* (L.) Crantz., *Liparis loeselii* (L.) Rich. e *Spiranthes aestivalis* (Poir.) Rich.

Si riportano di seguito le schede dei 17 generi di orchidee conservati presso la Banca del Germoplasma della Tuscia, oltre ad alcune schede di approfondimento su specie di particolare interesse che sono oggetto di specifiche ricerche o di progetti di conservazione: *Anacamptis palustris*, *Epipactis placentina* e *Limodorum trabutianum*. Le schede dei generi riportano informazioni generali, come numero di specie, distribuzione e habitat, oltre all'elenco delle specie conservate nella Banca del Germoplasma, con indicazioni sulle ricerche ed i progetti in corso.

Fig. 5. *Ophrys lutea* subsp. *minor* (foto F. Cianchi)

BIBLIOGRAFIA

Buono S., Magrini S., Bronzo F., Gransinigh E. & Rempicci M., 2011. Conservazione *ex situ* di *Ophrys lutea* Cav. subsp. *minor* (Tod.) O. Danesch & E. Danesch presso l'Orto Botanico e la Banca del Germoplasma dell'Università della Tuscia (Viterbo, Lazio). GIROS Notizie 46: 28-29.

Buono S., Rempicci M., Gransinigh E., Grassetti N., Chicote X., Haile G., Fonck M., Onofri S., Magrini S., 2013. *Ophrys* ×*grottagliensis* P. & C. Delforge (*Ophrys bertolonii* subsp. *bertolonii* × *Ophrys garganica*), a new hybrid population in central Italy. Journal Europäischer Orchideen 45 (1): 25-30.

Fay M.F., 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In Vitro Cellular & Developmental Biology 28: 1-4.

GIROS, 2009. Orchidee d'Italia: guida alle orchidee spontanee. Il Castello, Milano, Italia.

Magrini S., Bronzo F., Onofri S., Scoppola A., 2012a. Germinazione asimbiotica *in vitro* di semi immaturi di *Orchis palustris* Jacq. Studi Trentini di Scienze Naturali, 90: 159-164.

Magrini S., Buono S., De Vitis M., Haile G., Rempicci M., Gransinigh E., Scarici E., Fonck M., 2014. Conservation of endemics, rare and threatened Italian orchids in Botanical Garden and Tuscia Germplasm Bank (Viterbo, Central Italy). Journal Europäischer Orchideen 46(1): 103-114.

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Onofri S., Scoppola A., 2010. Outline analysis for identifying *Limodorum* species from seeds. In: Nimis P.L. & Vignes Lebbe R. (eds.), Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems: 249-250.

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Scoppola A., 2011a. An integrated strategy for the conservation of *Limodorum trabutianum* (Orchidaceae): the example of the *Marturanum* Park (Latium, Italy). 4th International Congress on Orchid Conservation "Orchids in a Changing World", May 29- June 6, 2011, Hluboká, Czech Republic: 86..

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Scoppola A., 2012b. Loss of reproductive success in orchids and germplasm banks: a study case in Northern Latium (Italy). First International Conference "The role of biobanks for research and protection of forest biodiversity". University of Tuscia, Viterbo (Italy), April 19-21, 2012. Book of Abstracts: 61-62.

Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A., 2011b. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*. European Journal of Environmental Sciences, 1(2): 71-79.

Magrini S., De Vitis M., Haile G., 2013a. *Ex situ* conservation of *Anacamptis* seeds: the role of dehydration, storage, and culture medium on germination. Proceedings of 5th International Orchid Workshop "Orchid population dynamics", Rende, Italy (17-19 May 2013): 24.

Magrini S., Haile G., De Vitis M., 2013b. Impacts of scarification methods on seeds germination in the genus *Limodorum*. Proceedings of 5th International Orchid Workshop "Orchid population dynamics", University of Calabria, Rende, Italy (17-19 May 2013): 14.

Magrini S., Rempicci M., Buono S. & Gransinigh E., 2012c. *Ex situ* conservation of *Epipactis placentina* Bongiorni & Grünanger (*Orchidaceae*) in Latium region (central Italy). Journal Europäischer Orchideen44 (2): 393- 402. 2012.

Magrini S., Rempicci M., Gransinigh E., Buono S., 2013c. Conservazione delle orchidee in Italia: l'esempio della collaborazione tra la Banca del Germoplasma della Tuscia e la Sezione "Etruria meridionale" del G.I.R.O.S. GIROS Notizie 52: 77-81.

Seaton P.T., Hu H., Perner H., Pritchard H.W., 2010. *Ex Situ* Conservation of Orchids in a Warming World. Botanical Review 76: 193-203.

Seaton P.T., Pritchard H.W., 2003. Orchid germplasm collection, storage and exchange. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb P.J. (Eds), Orchid conservation: 227-258. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Seaton P.T., Pritchard H.W., 2008. Life in the Freezer. Orchid Seed Banking for the Future. Orchids - The Bulletin of the American Orchid Society October: 762-773.

Swarts, N.D., Dixon K.W., 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Annals of Botany 104: 543-556.

A lato: *Ophrys tenthredinifera* (foto S. Buono)

Schede dei generi e delle principali specie conservate

gen. *Anacamptis* Rich.

Il gen. *Anacamptis*, prima monospecifico, comprende adesso una trentina di specie, in precedenza attribuite in gran parte al gen. *Orchis*; le specie europee sono 9 di cui 8 sono presenti in Italia.

DISTRIBUZIONE: areale mediterraneo e centro-europeo che si estende sino al Caucaso e all'Iran

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 36 accessioni di semi di 9 entità appartenenti a 6 specie, oltre ad un ibrido naturale:

- *Anacamptis coriophora* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Anacamptis morio* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Anacamptis papilionacea* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich.
- *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. var. *nivea* P. Delforge
- *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. var. *tanayensis* Chevenard
- *Anacamptis* x*gennarii* (Rchb. f.) H. Kretzschmar, Eccarius & H. Dietr.

È stato definito un protocollo per la germinazione asimbiotica *in vitro* di semi maturi di specie del genere *Anacamptis* (Magrini *et al*., 2011) e, nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*", sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione a T =-20°C sui semi di *Anacamptis laxiflora*, *A. morio*, *A. palustris*, *A. papilionacea* e *A. pyramidalis* (Magrini *et al*., 2013). Lo studio comparato della capacità germinativa *in vitro* di queste specie rispetto a specie dei generi *Neotinea* e *Orchis* è stato oggetto di una tesi di laurea magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici (De Carli, 2011).

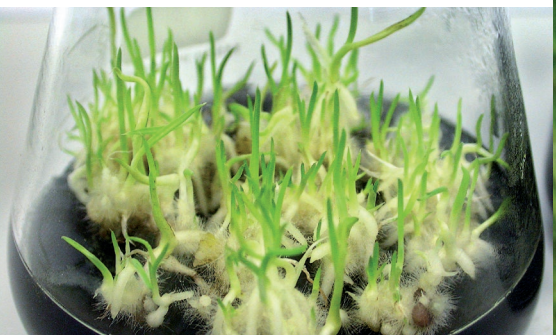
BIBLIOGRAFIA

De Carli A., 2011. Studio comparato della capacità germinativa di specie dei generi *Anacamptis*, *Neotinea* e *Orchis*. Tesi di Laurea Magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici. Rel: S. Onofri, Corr.: S. Magrini.

Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A., 2011. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (*Orchidaceae*), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*. European Journal of Environmental Sciences 1(2): 71-79.

Magrini S., De Vitis M., Haile G., 2013. *Ex situ* conservation of *Anacamptis* seeds: the role of dehydration, storage, and culture medium on germination. 5th International Orchid Workshop "Orchid population dynamics", University of Calabria, Rende, Italy (17-19 May 2013): 24.

A lato: *Anacamptis pyramidalis* (foto S. Buono)
In basso (da sx a dx): plantule di *A. laxiflora* riprodotte *in vitro* (foto S. Magrini) e particolare del fiore (foto S.Buono)



Anacamptis palustris (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon e M.W. Chase

SINONIMO: *Orchis palustris* Jacq.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: specie di praterie umide, paludi e acquitrini salmastri, da 0 a 500 m di quota, diffusa nel bacino del Mediterraneo e in Europa centrale e settentrionale con un areale molto frammentato.

CONSERVAZIONE:
Riportata come "minacciata" (EN) nella Lista Rossa della flora italiana (Rossi *et al*., 2013). Presso la BGT sono conservate 13 accessioni di semi provenienti da 3 popolazioni italiane, Bagnaccio (Viterbo), Bassa del Bardello, Cervia (Ravenna), Calambrone (Pisa) e da una popolazione in Svizzera. Nell'ambito del progetto "*Conservazione delle orchidee delle Oasi WWF*", che per il primo anno prevede la conservazione di specie di ambienti umidi, altri semi saranno raccolti in varie popolazioni italiane, come nelle Oasi di Orbetello e di Burano (Grosseto). Per questa specie sono stati definiti protocolli di germinazione asimbiotica *in vitro*, utilizzando sia semi immaturi che maturi (Magrini *et al*., 2011, 2012). Inoltre è una delle specie testate per il progetto "OSSSU" (Magrini *et al*., 2013). In collaborazione con l'Orto Botanico, nell'ambito del progetto "*Recupero naturalistico di un'area degradata in prossimità della sorgente termale del Bagnaccio per la conservazione* ex situ *di specie della flora autoctona del Viterbese*" si prevede la traslocazione di parte della popolazione spontanea viterbese, fortemente minacciata, all'interno di un'area protetta.

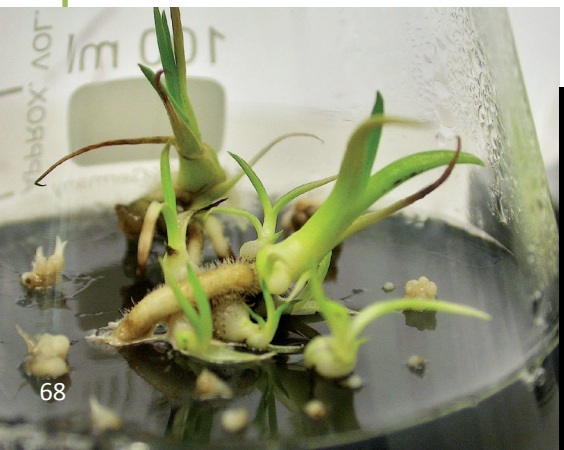
BIBLIOGRAFIA

Magrini S., Bronzo F., Onofri S., Scoppola A., 2012. Germinazione asimbiotica *in vitro* di semi immaturi di *Orchis palustris* Jacq. Studi Trentini di Scienze Naturali 90: 159-164.

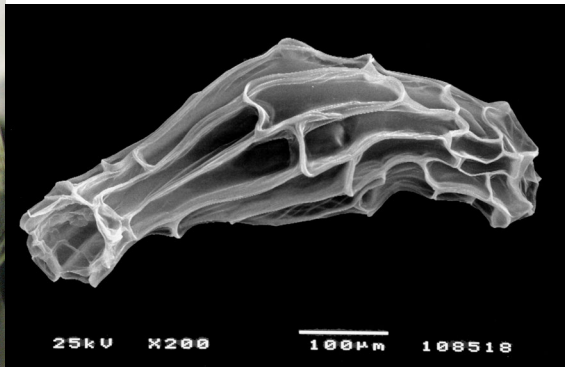
Magrini S., De Carli A., Onofri S., Scoppola A., 2011. A comparative study of the seed germination capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid, and other more common *Anacamptis* species, by asymbiotic culture *in vitro*. European Journal of Environmental Sciences 1(2): 71-79.

Magrini S., De Vitis M., Haile G., 2013. *Ex situ* conservation of *Anacamptis* seeds: the role of dehydration, storage, and culture medium on germination. 5th International Orchid Workshop "Orchid population dynamics",University of Calabria, Rende, Italy (17-19 May 2013): 24.

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.



A lato: fiori di *Anacamptis palustris* (foto S. Magrini)
In basso (da sx a dx): plantule riprodotte *in vitro* (foto S. Magrini) e foto al SEM di un seme



Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

gen. *Barlia* (Biv.) Parl.

Il genere *Barlia* comprende 2 specie, *Barlia metlesicsiana* Teschner, un endemismo dell'isola di Tenerife (Canarie), e *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter, unica specie presente in Italia.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: *Barlia robertiana* ha distribuzione stenomediterranea, dal Marocco e dalla penisola iberica a Cipro e alla Turchia.
In Italia è molto rara al Nord salvo che in Liguria occidentale, frequente in Toscana, Puglia, Sicilia e Sardegna. È diffusa lungo le coste mediterranee in ambienti aperti e soleggiati, come garighe e pascoli rocciosi, da 0 a 900 m di quota.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT è conservata una accessione di semi di *Barlia robertiana*, unica specie presente in Italia, provenienti da una popolazione pugliese.

A lato: piante di *Barlia robertiana* (foto E. Gransinigh). In basso (da sx a dx): capsule immature (foto S. Magrini) e particolare dell'infiorescenza (foto S. Buono)

gen. *Cephalanthera* Rich.

Il genere *Cephalanthera* comprende una ventina di entità, ma le specie europee sono 8 e solo 3 sono presenti in Italia: *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce, *C. longifolia* (L.) Fritsch e *C. rubra* (L.) Rich.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: il genere ha una distribuzione prevalentemente eurasiatica, con un'unica specie presente in Nordamerica. L'habitat più frequente per le specie italiane è localizzato nel piano collinare e submontano: boschi, cespuglieti e radure, con preferenza per substrati neutri o calcarei e posizioni a mezz'ombra

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate accessioni di semi di 2 delle 3 specie italiane:

- *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce
- *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch

A lato: piante di *Cephalanthera damasonium* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): particolare dei fiori di *C. longifolia* (foto M. Rempicci) e di *C. damasonium* (foto S. Buono)

Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

gen. *Cypripedium* L.

Il genere comprende circa 40-50 specie circumboreali, delle quali 3 sono presenti in Europa e una sola in Italia: *Cypripedium calceolus* L., noto come Scarpetta di Venere o Pianella della Madonna.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: il genere è diffuso nell'emisfero boreale: Nord e Centro America, Europa, Asia centrale e orientale. In particolare *C. calceolus* ha distribuzione eurosiberiana, limitata alle aree montane nella parte meridionale del suo areale. In Italia è presente in molte stazioni delle Alpi orientali, soprattutto in Trentino Alto Adige, ma risulta rarissima nel resto della catena alpina e soprattutto nell'Appennino Abruzzese. Vive in ambienti montani preferibilmente umidi e su substrato calcareo, in boschi chiari e cespuglieti, tra 500 e 2000 m di quota.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservati semi di *Cypripedium calceolus*, unica specie presente in Italia, provenienti da una popolazione trentina, presso Pieve Tesino (TN).
La specie (inclusa nella Direttiva Habitat) è stata valutata recentemente come "A minor rischio" (LC) per le nuove Liste Rosse della Flora Italiana (Rossi *et al*., 2013), ma mentre nell'arco alpino complessivamente non risulta minacciata, nelle stazioni appenninche è sicuramente soggetta ad un rischio di estinzione maggiore.

BIBLIOGRAFIA

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

A lato: piante di *Cypripedium calceolus* (foto E. Gransinigh). In basso (da sx a dx): capsule mature e semi (foto S. Magrini) e particolare del fiore (foto E. Gransinigh)

gen. *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski

Il genere *Dactylorhiza* a lungo è stato compreso in *Orchis s.l.*, dal quale invece è distante come filogenesi e anche per alcune costanti morfologiche (radici palmate invece di tuberi interi, brattee più lunghe dell'ovario, borsicola non unica ma nettamente bilobata).
A seconda degli autori il numero delle specie varia da una sessantina a un centinaio; in Europa sono oltre 45, da 7 a 16, a seconda degli autori, in Italia.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: genere a distribuzione principalmente eurasiatica.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservate 13 accessioni di semi di 4 specie:

- *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó subsp. *incarnata*
- *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó *s.l.*
- *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soó subsp. *romana*
- *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó

Per 2 specie, *Dactylorhiza maculata* e *D. romana*, sono stati definiti protocolli di germinazione asimbiotica *in vitro* e sono stati testati sui semi gli effetti della deidratazione e della conservazione a T =-20°C nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*".

A lato: infiorescenza di *Dactylorhiza maculata* con impollinatore (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): protocormi di *D. romana in vitro*, con rizoidi e abbozzo fogliare (foto M. De Vitis) e infiorescenza di *D. sambucina* (foto S. Magrini)

gen. *Epipactis* Zinn

Il genere *Epipactis* comprende circa 70 specie diffuse in Europa, in Asia e in America, delle quali circa 20-30, a seconda degli autori, sono spontanee della nostra flora. La controversa e incerta tassonomia di molte entità è causata principalmente dalla loro variabilità morfologica al variare delle condizioni ambientali.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: genere a distribuzione essenzialmente eurasiatica. In Italia le *Epipactis* vivono in aree boschive, dai querceti termofili fino alle faggete.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 17 accessioni di semi di 5 specie raccolti in Piemonte, Toscana e Lazio:

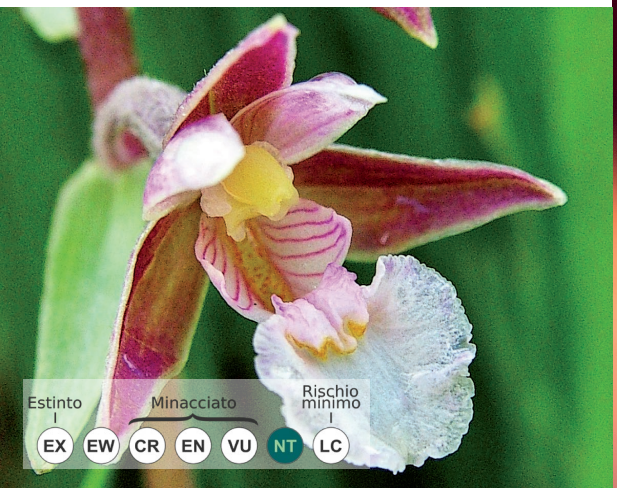
- *Epipactis helleborine* (L.) Crantz subsp. *helleborine*
- *Epipactis microphylla* (Ehrh.) Sw.
- *Epipactis palustris* (L.) Crantz
- *Epipactis persica* (Soó) Nannf. subsp. *gracilis* (B. & H. Baumann) W. Rossi
- *Epipactis placentina* Bongiorni & Grünanger

Durante il 2014, saranno raccolti semi di *E. palustris* in varie popolazioni nelle Oasi WWF in Italia, nell'ambito del progetto "*Conservazione delle orchidee delle Oasi WWF*", che per il primo anno prevede proprio la conservazione di specie di ambienti umidi. Lo stato di conservazione in Italia di questa specie è stato recentemente valutato nella nuova Lista Rossa della Flora Italiana (Rossi *et al*., 2013) dove è riportata come NT, "Quasi minacciata". Nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*" sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione dei semi di *E. helleborine* e *E. placentina*.

BIBLIOGRAFIA

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

A lato: piante di *Epipactis placentina* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): fiori di *E. palustris* (foto S. Buono) e di *E. microphylla* (foto M. Rempicci)



Epipactis placentina
Bongiorni & Grünanger

DISTRIBUZIONE: specie endemica dell'Europa centro-meridionale, con distribuzione eurimediterranea, rara e localizzata in diverse regioni italiane dal Veneto alla Sicilia, segnalata anche nelle Alpi Francesi, in Svizzera e Slovacchia. Vive in faggete e ambienti boschivi freschi, preferibilmente a mezz'ombra, su suoli profondi, neutri o poco acidi, da 100 a 1400 m di quota.

CONSERVAZIONE

Specie valutata come "Minacciata" (Endangered, EN) nella recente lista rossa europea (Bilz *et al.*, 2011) e in fase di valutazione nel 2014 per le Liste Rosse della flora italiana, risulta essere minacciata soprattutto lungo la dorsale appenninica Nord Occidentale (Bongiorni *et al.*, 2009) e nel Centro Italia (Magrini *et al.*, 2012a,b), dove la siccità estiva ne limita o ne impedisce la fruttificazione, determinandone così una progressiva rarefazione.
Presso la BGT sono conservate 3 accessioni di semi raccolti fra il 2009 e il 2010 nelle popolazioni delle faggete del Monte Fogliano (Viterbo). È ancora in fase di definizione un protocollo per la scarificazione dei semi e per la loro germinazione asimbiotica.

BIBLIOGRAFIA

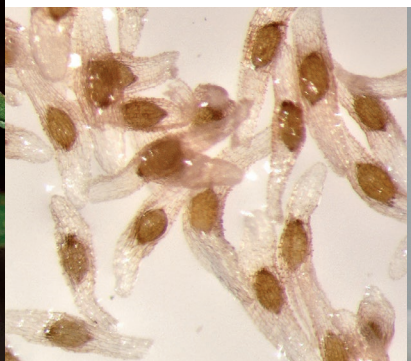
Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V., 2011. European Red List of Vascular Plants. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Bongiorni, L., De Vivo, R., Fori S., 2009. *Epipactis placentina* Bongiorni & Grünanger (Orchidaceae) in Italy. Journal Europäischer Orchideen 41(3/4): 501-512.

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Scoppola A., 2012a. Loss of reproductive success in orchids and germplasm banks: a study case in Northern Latium (Italy). First International Conference "The role of biobanks for research and protection of forest biodiversity". University of Tuscia, Viterbo (Italy), April 19-21, 2012. Book of Abstracts: 61-62.

Magrini S., Rempicci M., Buono S., Gransinigh E., 2012b. *Ex situ* conservation of Epipactis placentina Bongiorni & Grünanger (Orchidaceae) in the Latium region (central Italy). Journal Europäischer Orchideen 44 (2): 501-510.

A lato: infiorescenza di *Epipactis placentina* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): capsula immatura (foto S. Buono), semi maturi (foto S. Magrini) e vials con semi deidratati per OSSSU (foto S. Magrini)



Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

gen. *Epipogium* Borkh.

Il genere *Epipogium* comprende da 2 a 5 specie a seconda degli Autori, delle quali una sola presente in Europa e in Italia: *Epipogium aphyllum* Sw.

DISTRIBUZIONE: il genere ha distribuzione eurosiberiana e tropicale, *E. aphyllum* è limitato all'area eurosiberiana, dai Pirenei al Giappone; in Italia è una specie abbastanza rara, sempre molto localizzata, con un maggior numero di stazioni sulle Alpi orientali ma più sporadica nel resto delle Alpi e lungo l'Appennino fino alla Calabria.
Vive in boschi montani su substrati freschi e ricchi di humus, da acidi a basici (faggete, peccete, abetine), da 400 a oltre 1700 m di quota.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservati semi di *Epipogium aphyllum* provenienti da una popolazione abruzzese.

A lato: piante di *Epipogium aphyllum* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): fiore con un insetto impollinatore (foto M. Rempicci) e particolare del fiore (foto S. Buono)

Estinto
Minacciato
Rischio minimo
EX
EW
CR
EN
VU
NT
LC

gen. *Himantoglossum* Spreng.

Il genere comprende 5 specie (più 2 incerte, di probabile origine ibridogena), solo 2 presenti in Italia: *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann e *H. hircinum* (L.) Spreng.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: il genere ha distribuzione euromediterranea, in ambienti calcarei e aridi, in piena luce o mezz'ombra.

CONSERVAZIONE

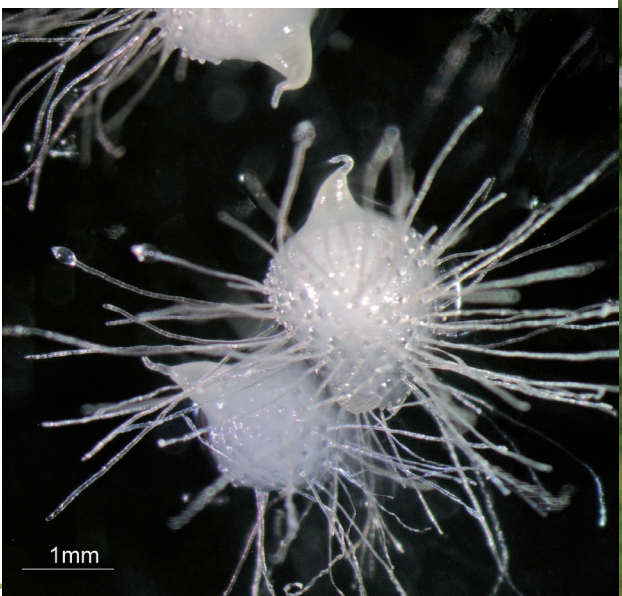
Himantoglossum adriaticum è una specie inclusa nell'Allegato II della Direttiva 92/43/CEE "Habitat" relativo alle "Specie animali e vegetali d'interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di Zone Speciali di Conservazione" e recentemente è stato valutato a livello nazionale come "A minor rischio" (LC) nelle Lista Rossa della Flora Italiana (Rossi *et al*., 2013).

Presso la BGT sono conservate 4 accessioni di semi di *H. adriaticum* raccolti da 4 popolazioni nel Lazio. Nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*" sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione a T =-20°C sui semi. Sono stati definiti protocolli per la germinazione asimbiotica *in vitro* di semi maturi.

BIBLIOGRAFIA

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

A lato: particolare del fiore di *Himantoglossum adriaticum* (foto S. Buono). In basso (da sx a dx): protocormi *in vitro* con rizoidi e abbozzi fogliari (foto M. De Vitis) e infiorescenza (foto S. Magrini)



gen. *Limodorum* Boehm.

Il genere *Limodorum* comprende 4 entità mixotrofe (cioè largamente dipendenti dal fungo simbionte, ma anche fotosintetiche, sebbene in minima parte), di cui 3 presenti in Italia.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: genere a distribuzione mediterranea-atlantica. I *Limodorum* preferiscono substrati permeabili, anche calcarei, ombrosi o a mezz'ombra, soprattutto boschi termofili o cespuglieti e radure.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 23 accessioni di semi delle 3 specie italiane provenienti da Toscana, Lazio e Calabria:

- *Limodorum abortivum* (L.) Sw.
- *Limodorum brulloi* Bartolo & Pulv.
- *Limodorum trabutianum* Batt.

Per le 3 specie sono stati definiti protocolli di scarificazione e di germinazione asimbiotica *in vitro* (Magrini *et al*., 2013; Magrini & De Vitis, 2014). Inoltre, nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*" sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione a T = -20°C. Studi di morfometria geometrica sui semi di *L. abortivum* e *L. trabutianum* hanno fornito un metodo per poter riconoscere, attraverso la forma dei semi, le 2 specie, che spesso convivono nella stessa stazione, anche durante la fruttificazione (Magrini *et al*., 2010).

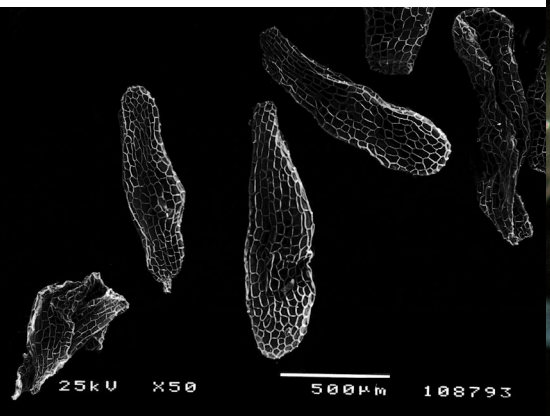
BIBLIOGRAFIA

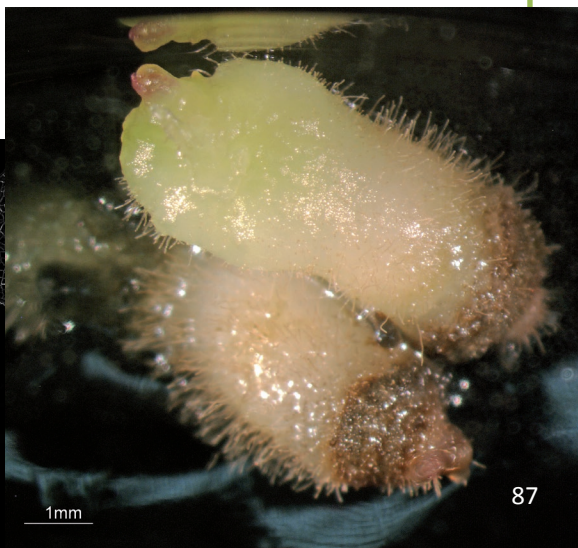
Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Onofri S., Scoppola A., 2010. Outline analysis for identifying *Limodorum* species from seeds. International Congress, Paris, September 20-22, 2010. In: Nimis P.L., Vignes Lebbe R. (eds.), Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems: 249-250.

Magrini S., De Vitis M., 2014. Impacts of scarification methods and nitrogen source on seeds germination in the genus *Limodorum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (submitted)

Magrini S., Haile G., De Vitis M., 2013. Impacts of scarification methods on seeds germination in the genus *Limodorum*. Proceedings of 5th International Orchid Workshop "Orchid population dynamics",University of Calabria, Rende, Italy (17-19 May 2013): 14.

A lato: piante di *Limodorum trabutianum* (foto E. Gransinigh). In basso (da sx a dx): foto al SEM di semi di *L. abortivum* e protocormi *in vitro* (foto S. Magrini)





Limodorum trabutianum Batt.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: in Italia è segnalato in Sardegna, Sicilia (Lampedusa) e in pochissime stazioni di Toscana, Umbria e Lazio. Preferisce substrati permeabili, anche calcarei, ombrosi o a mezz'ombra: soprattutto boschi termofili o cespuglieti e radure, dal livello del mare fino a 900 m di quota.

CONSERVAZIONE

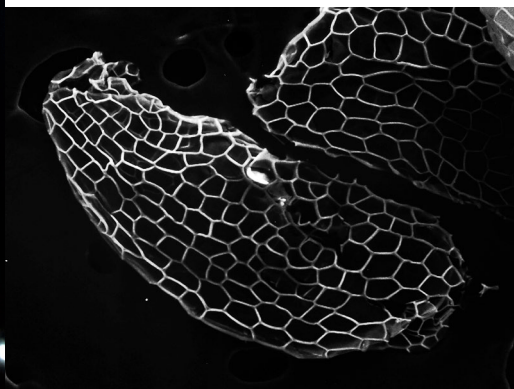
Limodorum trabutianum è elencato come "Vulnerabile" nelle Liste Rosse della Flora Italiana (Conti *et al*., 1997) ed è attualmento in fase di nuova valutazione per la nuova Lista Rossa.
Abbondante solo in Sardegna e sull'Isola di Lampedusa, le 5 popolazioni dell'Italia centrale contano un numero di individui estremamente basso e sono soggette a serie minacce.
Per fermare il declino registrato nella popolazione presente all'interno del Parco *Marturanum* (Barbarano Romano, Viterbo), nel 2011 è stato intrapreso un progetto dal titolo"*Proposta di azioni per la conservazione* in situ *della popolazione di* Limodorum trabutianum *all'interno del Parco Regionale* Marturanum", in collaborazione con l'associazione GIROS ed il Parco *Marturanum* (Magrini *et al*., 2011). Come evidenziato anche per alcune *Epipactis*, la siccità estiva rappresenta una minaccia per la sua capacità riproduttiva (Magrini *et al*., 2012).
Presso la BGT sono conservate 13 accessioni di semi raccolti negli anni 2009-2013 in 3 popolazioni di Lazio e Toscana.

BIBLIOGRAFIA

Conti F., Manzi A., Pedrotti F., 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. WWF Italia, Società Botanica Italiana, Univ. Camerino. 139 pp.

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Scoppola A., 2011. An integrated strategy for the conservation of *Limodorum trabutianum* (*Orchidaceae*): the example of the *Marturanum* Park (Latium, Italy). 4th International Orchid Conservation Congress (IOCC4) "Orchids in a Changing World", Hlubockà, Czech Republic, May 29-June 3, 2011: 86.

Magrini S., Buono S., Gransinigh E., Rempicci M., Scoppola A., 2012. Loss of reproductive success in orchids and germplasm banks: a study case in Northern Latium (Italy). In: First International Conference "The role of biobanks for research and protection of forest biodiversity". University of Tuscia, Viterbo (Italy), April 19-21, 2012. Book of Abstracts: 61-62.



A lato: infiorescenza di *Limodorum trabutianum* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): protocormo *in vitro*, dove sono visibili 3 cicli di squame (foto S. Magrini) e foto al SEM di semi

Estinto
Minacciato
Basso rischio
EX
EW
CR
EN
VU
cd
nt
lc

gen. *Listera* R. Br.

Il genere *Listera* comprende oltre 40 specie, due delle quali presenti in Europa e in Italia: *Listera cordata* (L.) R.Br. in W.T. Aiton e *L. ovata* (L.) R.Br. in W.T. Aiton.

DISTRIBUZIONE: il genere ha distribuzione circumboreale (regioni temperate e fredde dell'emisfero Nord). *Listera cordata*, specie circumpolare, diffusa soprattutto nella zona fredda eurasiatica e nordamericana, nell'Europa meridionale esclusiva dello stadio montano e subalpino, vive in ambienti umidi e muscosi (peccete, vaccinieti) su suoli acidi, da 900 a oltre 2000 m di quota. *Listera ovata*, specie eurasiatica, comune nelle regioni temperate, meno in quelle mediterranee, è abbastanza indifferente al tipo di substrato, si adatta agli ambienti più vari, asciutti o umidi, anche in ombra, dal livello del mare fin oltre i 2000 m di quota.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservati semi di *Listera ovata* provenienti dai Monti Simbruini.

A sinistra: pianta di *Listera ovata* (foto E. Gransinigh); a destra: particolare del fiore (foto E. Gransinigh)

gen. *Neotinea* Rchb.f.

Il genere *Neotinea*, ritenuto monospecifico in passato, comprende attualmente 5 specie (6 o 7 per alcuni autori), precedentemente attribuite in gran parte al genere *Orchis*, delle quali almeno 4 certe e presenti in Italia.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: il genere ha un areale mediterraneo ed europeo (escluso il Nordeuropa), a partire dalle coste atlantiche fino al Caucaso. Habitat preferenziali sono praterie, garighe, pascoli cespugliati, macchie e boschi radi, su suolo calcareo per la maggior parte delle specie.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 6 accessioni di semi di 3 specie:

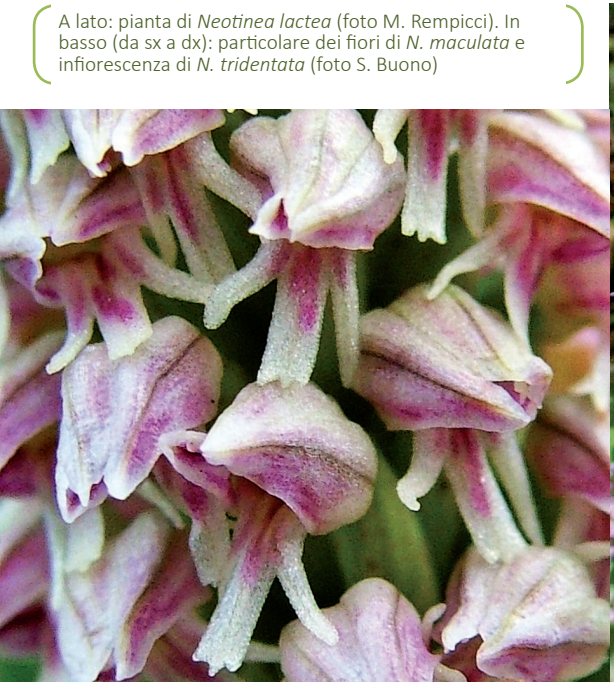
- *Neotinea lactea* (Poir.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase
- *Neotinea maculata* (Desf.) Stearn
- *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase

Lo studio comparato della capacità germinativa *in vitro* di *Neotinea lactea* e *N. tridentata* rispetto a quella di specie dei generi *Anacamptis* e *Orchis*, è stato oggetto di una tesi di laurea magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici (De Carli, 2011).

BIBLIOGRAFIA

De Carli A., 2011. Studio comparato della capacità germinativa di specie dei generi *Anacamptis*, *Neotinea* e *Orchis*. Tesi di Laurea Magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici. Rel.: S. Onofri; Correl.: S. Magrini.

A lato: pianta di *Neotinea lactea* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): particolare dei fiori di *N. maculata* e infiorescenza di *N. tridentata* (foto S. Buono)



gen. *Neottia* Guett.

A seconda delle classificazioni il genere comprende da oltre una decina a una ventina di specie in gran parte diffuse nelle regioni temperate dell'Asia: una soltanto è presente anche in Europa e in Italia: *Neottia nidus-avis* (L.) Rich.

DISTRIBUZIONE E HABITAT: genere a distribuzione eurasiatica, in particolare *Neottia nidus-avis* è diffusa in tutte le regioni temperate e meridionali. In Italia è presente in tutte le regioni e abbastanza frequente su suoli profondi e ricchi di humus, neutri o basici, di solito in boschi freschi e ombrosi, fino a 2000 m di quota.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 3 accessioni di semi dell'unica specie italiana, *Neottia nidus-avis* (L.) Rich., raccolti in popolazioni del Viterbese.

A sinistra: pianta di *Neottia nidus-avis* (foto S. Buono). A destra: particolari dei fiori (foto S. Buono)

gen. *Ophrys* L.

Il genere *Ophrys* è composto da un numero di specie che va da 19 a 250, a seconda degli Autori.

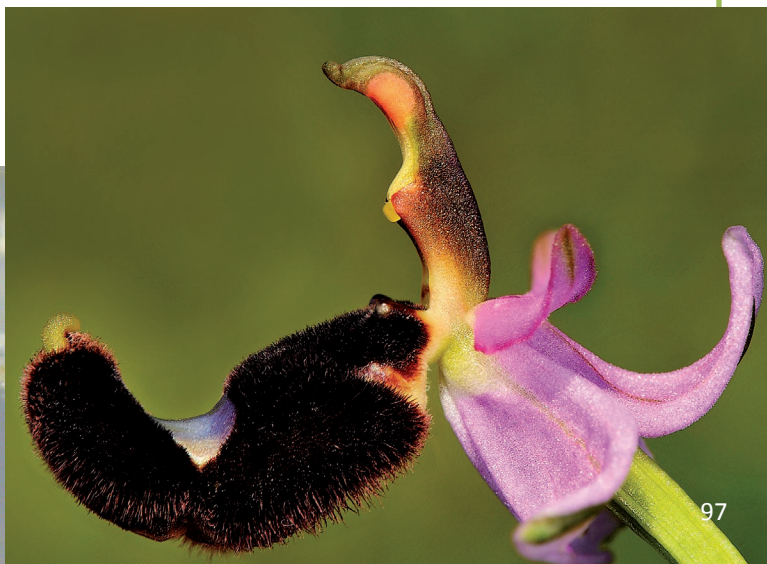
DISTRIBUZIONE: eurimediterranea.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservate 30 accessioni di semi di 15 entità:

- *Ophrys apifera* Huds.
- *Ophrys argentaria* Devillers-Tersch. & Devillers
- *Ophrys bertolonii* Moretti subsp. *bertolonii*
- *Ophrys bombyliflora* Link
- *Ophrys argolica* Fleischm. subsp. *crabronifera* (Sebast. & Mauri) Faurh.
- *Ophrys exaltata* Ten. subsp. *montis-leonis* (O. Danesch & E. Danesch) Soca (=*O. tyrrhena* Gölz & H.R. Reinhard)
- *Ophrys fusca* Link subsp. *funerea* (Viv.) Arcang.
- *Ophrys holosericea* (Burm.f.) Greuter
- *Ophrys incubacea* Bianca ex Tod. subsp. *incubacea*
- *Ophrys lutea* Cav. subsp. *minor* (Tod.) O. Danesch & E. Danesch
- *Ophrys sphegodes* Mill. subsp. *passionis* (Sennen) Sanz & Nuet (=*O. garganica* O. Danesch & E. Danesch)
- *Ophrys sphegodes* Mill. subsp. *majellensis* Helga & Herm. Daiss
- *Ophrys sphegodes* Mill. subsp. *tarquinia* (P. Delforge) Kreutz
- *Ophrys tenthredinifera* Willd.
- *Ophrys* x*grottagliensis* P. & C. Delforge

Nell'ambito del progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*" sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione a T = -20°C su semi di *Ophrys apifera* e *O. sphegodes* subsp. *passionis* per le quali sono stati definiti protocolli per la germinazione asimbiotica *in vitro.*

A lato: *Ophrys holosericea* (foto E. Gransinigh). In basso (da sx a dx): plantula *in vitro* di *O. sphegodes* subsp. *passionis* (foto S. Magrini) e fiore di *O. bertolonii* (foto M. Rempicci)



gen. *Orchis* L.

Il "nuovo" genere *Orchis*, che in passato era molto più ampio, comprendendo molte specie dei generi *Anacamptis* e *Neotinea*, rimane comunque un genere importante con circa 30 specie, delle quali 16 presenti in Italia.

DISTRIBUZIONE: eurimediterranea.

CONSERVAZIONE

Presso la BGT sono conservate 15 accessioni di semi di 8 specie raccolti in Toscana, Lazio e Puglia:

- *Orchis anthropophora* (L.) All.
- *Orchis italica* Poir.
- *Orchis mascula* Moris
- *Orchis militaris* L.
- *Orchis provincialis* Balb. ex Lam. & DC.
- *Orchis purpurea* Huds.
- *Orchis quadripunctata* Cirillo ex Ten.
- *Orchis simia* Lam.

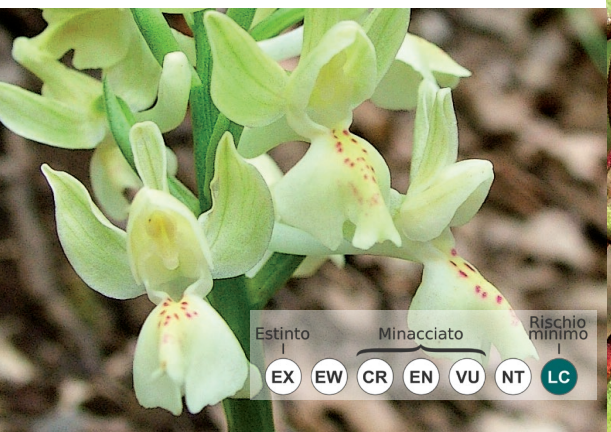
Fra le specie conservate è presente *O. provincialis*, protetta dalla Canvenzione di Berna, che è stata recentemente valutata come "A minor rischio" (LC) per la Lista Rossa della flora italiana (Rossi *et al*., 2013). Lo studio comparato della capacità germinativa *in vitro* di *Orchis italica*, *O. purpurea* e *O. mascula* con quella di specie dei generi *Anacamptis* e *Neotinea*, è stato oggetto di una tesi di laurea magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici (De Carli, 2011).

BIBLIOGRAFIA

De Carli A., 2011. Studio comparato della capacità germinativa di specie dei generi *Anacamptis*, *Neotinea* e *Orchis*. Tesi di Laurea Magistrale in Diversità dei Sistemi Biologici. Rel.: S. Onofri, Correl.: S. Magrini.

Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S (Eds.). 2013. Lista Rossa della Flora spontanea italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. IUCN Italia.

A lato: infiorescenza di *Orchis mascula* (foto M. Rempicci). In basso (da sx a dx): *O. provincialis* e fiori di *O. anthropophora* (foto S. Buono)



gen. *Platanthera* Rich.

Il genere *Platanthera* comprende da 80 a oltre 100 specie a seconda degli autori. In Europa sono presenti 13 specie delle quali solo 3 in Italia: *P. algeriensis* Batt. & Trab., *P. bifolia* (L.) Rich. e *P. chlorantha* (Custer) Rchb.

DISTRIBUZIONE: il genere ha una distribuzione circumboreale (Europa e Mediterraneo, Asia e America centro-settentrionale), dalle regioni artiche (Alaska, Scandinavia) a quelle equatoriali (Indonesia).

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservati i semi di *Platanthera chlorantha* provenienti dal Viterbese.

A lato: pianta di *Platanthera chlorantha* (foto M. Rempicci).
In basso (da sx a dx): capsule mature e particolare del fiore (foto M. Rempicci)

gen. *Serapias* L.

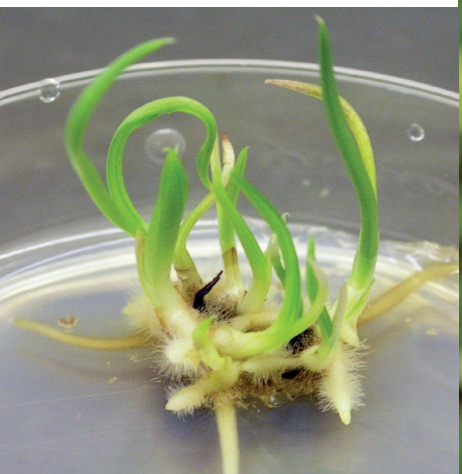
Il genere *Serapias* comprende dalle 20 alle 30 specie, a seconda degli autori, suddivise in due sezioni che si differenziano in base alla morfologia delle callosità basali del labello.
Le specie presenti in Italia sono 11.

DISTRIBUZIONE: il genere *Serapias* ha un areale centrato sul Mediterraneo, dalle Azzorre fino al Caucaso. Alcune specie come *S. vomeracea*, *S. cordigera*, *S. lingua* e *S. parviflora* sono ampiamente distribuite in tutto l'areale, altre sono endemismi più o meno ristretti.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservate 8 accessioni di semi di 4 specie provenienti da Lazio e Toscana:

- *Serapias cordigera* L.
- *Serapias lingua* L.
- *Serapias parviflora* Parl.
- *Serapias vomeracea* (Burm. f.) Briq. subsp. *vomeracea*

A lato: pianta di *Serapias lingua* (foto S. Buono). In basso (da sx a dx): plantule di *S. vomeracea in vitro* e infiorescenza di *S. cordigera* (foto S. Magrini)



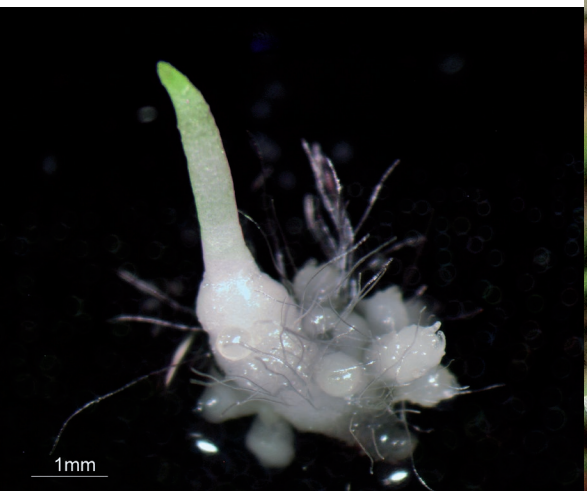
gen. *Spiranthes* Rich.

Il genere *Spiranthes* ha una sistematica particolarmente incerta, con un numero di specie che varia da 30 a 300 secondo i vari autori. Le specie europee sono solo 4, due delle quali presenti in Italia: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. e *S. aestivalis* (Poir.) Rich.
La specie più comune in Europa è certamente *S. spiralis*, inconfondibile soprattutto per la fioritura autunnale invece che estiva come le altre.

DISTRIBUZIONE: presente in tutti i continenti, ma la maggior parte delle specie sono nordamericane.

CONSERVAZIONE
Presso la BGT sono conservate 5 accessioni di semi di *Spiranthes spiralis* da Lazio e Piemonte. Sono stati definiti protocolli per la sua germinazione asimbiotica *in vitro*, utilizzando semi maturi e sono stati testati gli effetti della deidratazione e della conservazione a T = -20°C sui semi per il progetto "*Orchid Seed Stores for Sustainable Use - OSSSU*".
Nell'ambito del progetto "*Conservazione delle orchidee delle Oasi WWF*", che per il primo anno prevede la conservazione di specie di ambienti umidi, saranno raccolti semi anche di *Spiranthes aestivalis* in varie popolazioni italiane.

A lato: pianta di *Spiranthes spiralis* (foto E. Gransinigh). In basso (da sx a dx): protocormi *in vitro* con le prime foglie verdi (foto M. De Vitis) e particolare dei fiori (foto S. Buono)



Vademecum per la raccolta dei semi delle orchidee spontanee

Sara Magrini[1] e Sergio Buono[2]

[1]Banca del Germoplasma della Tuscia, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo. E-mail: magrini@unitus.it; [2]GIROS (Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee) Sezione "Etruria meridionale" Oriolo Romano (Viterbo). E-mail: sergood@libero.it

La raccolta dei semi delle orchidee richiede alcune accortezze per poter raccogliere campioni di semi che siano vitali e "conservabili". In particolare suggeriamo di seguire le seguenti fasi:

1. INDIVIDUAZIONE DELLA STAZIONE

- individuare le popolazioni durante la fioritura
- scegliere popolazioni numerose per poter raccogliere i semi senza danneggiarle
- utilizzare un GPS per la georeferenziazione della stazione

2. RICONOSCIMENTO TASSONOMICO DELL'ENTITÀ

- indicare specie, sottospecie e varietà
- indicare la bibliografia a cui si fa riferimento per la nomenclatura
- scattare foto che possano confermare la corretta determinazione dei *taxa*

3. COMPILAZIONE DELLA SCHEDA DI CAMPO

Per una corretta raccolta, è importante raccogliere i seguenti dati:

- i dati stazionali,
- i dati sulla dimensione della popolazione
- i dati sulle modalità di raccolta dei semi:
- n° di piante e n° di capsule/pianta
- i dati su eventuali minacce individuate e sullo stato di conservazione della popolazione

Esempi di marcatura delle piante per la raccolta dei semi con nastro segnaletico forato ad una estremità ed inserito fino alla base della pianta. A sinistra, Fig. 1. Piante di grandi dimensioni: *Orchis mascula* Moris (foto M. Rempicci). A destra, Fig. 2. Esempio di pianta di piccole dimensioni: *Neotinea lactea* (Poir.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (foto S. Buono)

Fig. 3. a) Piante di *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann marcate con il nastro legato appena sotto l'infiorescenza, per renderle visibile anche in mezzo a vegetazione erbacea folta e alta (foto S. Magrini); b) Esempio di nastri segnaletici con scritto il nome della specie, in questo caso: *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase e *A. xgennari* (Rchb. f.) H. Kretzschmar, Eccarius & H. Dietr. (foto S. Magrini)

4. MARCATURA DELLE PIANTE DURANTE LA FIORITURA

Si tratta di un'attività molto importante perché dopo la fioritura e durante tutta la fase della fruttificazione è difficoltoso, se non impossibile, individuare le piante fra la vegetazione e distinguere entità diverse dello stesso genere che vivono insieme.

Le piante possono essere segnate con un nastro segnaletico bianco-rosso (Fig. 1, 2, 3a,b). Si tagliano strisce lunghe almeno 20 cm nelle quali si dovrà ritagliare ad una estremità un foro sufficientemente ampio da essere infilato dall'apice della pianta fino alla base (Fig. 1 e 2).

Nel caso di piante di grandi dimensioni (*Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, *Orchis purpurea* Huds., *Himantoglossum*, ecc.) o di specie che vivono in ambienti dove la vegetazione circostante crescerà raggiungendo dimensioni maggiori delle orchidee da campionare (per es. canneti, prati umidi, prati non pascolati, ecc.) il nastro può essere legato in alto, annodandolo, senza stringere, alla base dell'infiorescenza così da poter localizzare più agevolmente le piante anche quando saranno in frutto (Fig. 3a).

Nel caso in cui più specie, anche dello stesso genere convivano nella stessa comunità (caso comune per le *Ophrys* o *Anacamptis*), è necessario scrivere il nome della specie da cui raccogliere i semi sul nastro segnaletico, così da evitare errori nella fase di raccolta (Fig. 3b).

5. CONTROLLO PERIODICO DELLO STATO FENOLOGICO

Sulla base dell'esperienza maturata, è stato osservato che è necessario circa un mese dall'impollinazione fino alla completa maturazione delle capsule.

N.B. È importante considerare le condizioni meteo e la stagione, soprattutto per specie a fioritura tardiva e fruttificazione a inizio estate (per es. Anacamptis palustris *o* Epipactis*), infatti un eccessivo innalzamento delle temperature o periodi siccitosi potrebbero determinare una diminuzione del tempo necessario per l'apertura delle capsule.*

Fig. 4. a) Infiorescenza multiflora di *Orchis italica* Poir. (foto S. Magrini); b) Infiorescenza pauciflora di *Ophrys incubacea* Bianca ex Tod. (foto M. Rempicci)

6. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO ED ENTITÀ DELLA RACCOLTA

Per raccogliere germoplasma che sia rappresentativo della variabilità genetica delle popolazioni campionate, ma senza comprometterne lo stato di conservazione è necessario seguire alcune regole.

La raccolta dovrebbe essere distribuita su tutta la stazione e non concentrata solo su poche piante, nè su una o poche aree (per evitare di raccogliere solo da cloni).

Alcune orchidee hanno infiorescenze più o meno dense, composte da numerosi fiori come ad esempio quelle dei generi: *Anacamptis*, *Orchis* (Fig. 4a), *Neotinea*, ecc., mentre altri generi quali *Ophrys* (Fig. 4b), *Serapias*, *Cypripedium,* ecc. hanno infiorescenze composte da pochi fiori. Per la raccolta è necessario considerare anche questo fatto come di seguito specificato:

- Nel caso di specie appartenenti a generi con infiorescenza multiflora (Fig. 4a), la raccolta deve essere effettuata almeno da 20 piante nel caso di popolazioni abbondanti, da 10 piante nel caso di piccole popolazioni. Si possono raccogliere 5 capsule per pianta, indipendentemente dal numero degli esemplari presenti.

- Nel caso di specie appartenenti a generi con infiorescenza pauciflora (Fig. 4b), la raccolta deve essere effettuata almeno da 30 piante nel caso di popolazioni abbondanti, da 15 piante nel caso di piccole popolazioni. Si possono raccogliere 2 capsule per pianta, indipendentemente dal numero di esemplari presenti nella stazione.

- Nel caso di specie a rischio di estinzione, se la popolazione è abbondante si possono seguire i criteri precedenti, ma nel caso di piccole popolazioni si consiglia uno sforzo di raccolta inferiore: 1-3 capsule per pianta (a seconda della numerosità dei fiori nell'infiorescenza) da un numero di piante che non superi il 10% della popolazione.

N.B. Questi numeri sono indicativi e si riferiscono SOLO ad una raccolta effettuata nel giusto momento. Nel caso di capsule già molto aperte questi numeri dovranno aumentare perché la maggior parte dei semi sarà già stata dispersa.

Fig. 5. a) Capsule immature di *Ophrys exaltata* Ten. subsp. *montis-leonis* (O. Danesch & E. Danesch) Soca (foto S. Buono); b) Capsule mature di *Anacamptis palustris:* si possono notare alcuni minuscoli semi usciti dalle aperture laterali (foto S. Magrini)

7. RACCOLTA DELLE CAPSULE CONTENENTI I SEMI

I semi dovranno essere raccolti a completa maturazione. Le capsule sono considerate mature nel momento in cui si seccano, diventano marroni e le fessure longitudinali iniziano ad aprirsi. A questo punto l'intera capsula va rimossa tagliandola alla base con le forbici, facendo attenzione a non romperla, a non far uscire troppi semi e a non danneggiare lo stelo della pianta. Tutte le capsule raccolte nella stessa popolazione devono essere messe in bustine di carta, avendo cura di chiuderle con nastro adesivo ripiegando più volte il bordo per evitare la perdita dei semi.

Ogni bustina dovrà riportare i seguenti dati:

- Data di raccolta
- Nome e cognome del raccoglitore
- Nome scientifico del *taxon*
- Stato, regione, provincia, comune e località

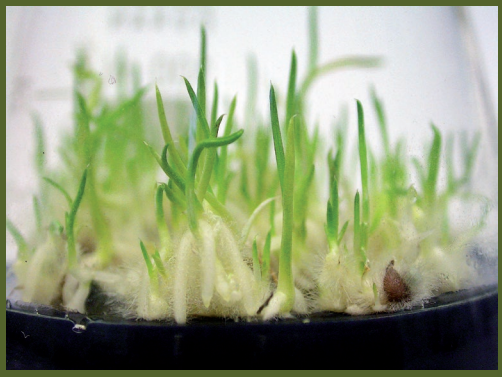
N.B. Evitare, bustine o contenitori di plastica, i semi si caricano di elettricità statica e si attaccano alle pareti, rendendo poi estremamente difficile rimuoverli.

Ophrys fusca Link subsp. *funerea* (Viv.) Arcang. (foto M. Rempicci)

Finito di stampare nel mese di maggio 2014
Tipolitografia Quatrini, Viterbo

LA BANCA DEL GERMOPLASMA DELLA TUSCIA

La Banca del Germoplasma della Tuscia (BGT) è una struttura di ricerca dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo istituita nel dicembre 2005, con sede presso i locali del Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche. La BGT si occupa istituzionalmente della conservazione *ex situ* del germoplasma (semi e spore) di specie endemiche, rare o minacciate della flora italiana, in particolare felci ed orchidee.
Dal 2008 le attività di ricerca si sono concentrate in particolare sulle orchidee spontanee, con riferimento alla loro conservazione *in situ/ ex situ*, alla definizione di protocolli per la conservazione a lungo termine dei semi, allo studio *in vitro* e *in situ* della capacità riproduttiva di specie rare o minacciate di estinzione, alla definizione di protocolli per la germinazione asimbiotica e riproduzione *in vitro*. Fondamentale è stata, in questi anni, la collaborazione con l'Associazione GIROS- *Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee*, in particolare con la Sezione "Etruria Meridionale" che ha fornito competenze e supporto in campo per tutte le attività di conservazione delle orchidee.
La Banca del Germoplasma della Tuscia fa parte del Sistema Museale di Ateneo ed è uno dei soci fondatori di RIBES - *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione* Ex Situ *della flora spontanea*, un'associazione scientifica che unisce 18 istituzioni analoghe distribuite su tutto il territorio italiano per azioni comuni legate alla conservazione *ex situ* e alla divulgazione scientifica (www.reteribes.it).



ISBN: 978-88-909977-0-9