



Azione A11

Deliverable

**Protocol
for the *ex-situ* conservation
of the 5 target plant species
from Annex II-IV present in Umbria
and the selected "H-key" species**

Protocol
for the *ex-situ* conservation
of the 5 target plant species
from Annex II-IV present in Umbria
and the selected "H-key" species

Azione A11

30/09/2022

LIFE IPE IMAGINE
LIFE19 IPE/IT/00015

**Realizzato da DSA3 - Dip. di Scienze Agrarie, Alimentari e
Ambientali, Università degli Studi di Perugia**

**Responsabile
scientifico:** Valeria Negri

**Gruppo di
lavoro:** Simona Ciancaleoni, Lorenzo Raggi,
Federica Bonini, Valentina Ferri,
Daniela Gigante



Sommario

SEZIONE 1 - RACCOLTA DEL GERMOPLASMA DI SPECIE SPONTANEE	2
Premessa	2
Introduzione	2
Obiettivi della raccolta	2
Criteri per il campionamento	3
Scelta delle stazioni di raccolta	3
Criteri di scelta delle stazioni.....	3
Metodi di campionamento	3
Criteri di scelta delle popolazioni	3
Scelta del numero di individui da campionare	4
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	5
Raccolta in campo del germoplasma	5
Protocollo tecnico di raccolta in campo	6
Protocollo per popolazioni di dimensioni estremamente ridotte.....	7
Documentazione sulla raccolta	7
Equipaggiamento per la raccolta del germoplasma.....	7
In sintesi	8
SEZIONE 1 - PROTOCOLLI PER LA RACCOLTA DI GERMOPLASMA DELLE 5 SPECIE TARGET E DELLE H-KEY SPECIES PRESENTI IN UMBRIA	9
Obiettivi della raccolta	9
<i>Himantoglossum adriaticum</i> H. Baumann	9
Criteri per il campionamento	9
Scelta delle stazioni di raccolta.....	9
Criteri di scelta delle stazioni.....	9
Metodi di campionamento.....	10
Criteri di scelta delle popolazioni	10
Scelta del numero di individui da campionare	11
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	11
Raccolta in campo del germoplasma	11

Popolazioni di dimensioni estremamente ridotte.....	12
Protocollo tecnico di raccolta in campo	12
<i>Iris marsica</i> I. Ricci & Colas.....	12
Criteri per il campionamento	12
Scelta delle stazioni di raccolta.....	12
Metodi di campionamento.....	13
Criteri di scelta delle popolazioni	13
Scelta del numero di individui da campionare	13
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	14
Raccolta in campo del germoplasma	14
Protocollo tecnico di raccolta in campo	14
<i>Adonis distorta</i> Ten.	14
Criteri per il campionamento	14
Scelta delle stazioni di raccolta.....	14
Metodi di campionamento.....	15
Scelta del numero di individui da campionare	15
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	15
Raccolta in campo del germoplasma	15
Protocollo tecnico di raccolta in campo	16
<i>Klasea lycopifolia</i> (Vill.) Á.Löve et D.Löve	16
Criteri per il campionamento	16
Scelta delle stazioni di raccolta.....	16
Metodi di campionamento.....	16
Criteri di scelta delle popolazioni	16
Scelta del numero di individui da campionare	17
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	17
Raccolta in campo del germoplasma	18
Protocollo tecnico di raccolta in campo	18
<i>Ionopsidium savianum</i> (Caruel) Ball ex Arcang.	18
Criteri per il campionamento	18
Scelta delle stazioni di raccolta.....	18
Metodi di campionamento.....	18
Criteri di scelta delle popolazioni	18

Scelta del numero di individui da campionare	19
Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare	19
Raccolta in campo del germoplasma	19
Protocollo tecnico di raccolta in campo	19
H-Key Species	19
BIBLIOGRAFIA	25
SEZIONE 2 - CONSERVAZIONE <i>EX SITU</i> E GESTIONE DELLE BANCHE DI GERMOPLASMA	29
Introduzione	29
La conservazione <i>ex situ</i>: principi generali	29
La conservazione <i>ex situ</i> di piante intere	30
Problemi e conduzione.....	30
Conservazione <i>ex situ</i> di parti di pianta (propaguli)	31
La conservazione di semi.....	31
La conservazione <i>in vitro</i>	32
Tipi di colture adatte alla conservazione in vitro	32
Sistemi in vitro a crescita rallentata	33
La crioconservazione	34
Gestione di una banca di germoplasma	34
1. Ingresso nella banca del germoplasma e dati di passaporto	34
2. Conservazione	35
3. Caratterizzazione e valutazione.....	37
4. Moltiplicazione e rigenerazione	37
5. Gestione delle informazioni	39
6. Utilizzazione e scambio di materiali ed informazioni.....	39
SEZIONE 2 - PROTOCOLLI DI CONSERVAZIONE <i>EX SITU</i> DELLE 5 SPECIE TARGET ANNEX II-IV PRESENTI IN UMBRIA E DELLE SPECIE "H-KEY" SELEZIONATE	41
<i>Himantoglossum adriaticum</i> H. Baumann	41
<i>Iris marsica</i> I. Ricci & Colas	41
<i>Adonis distorta</i> Ten.	41
<i>Klasea lycopifolia</i> (Vill.) Á.Löve et D.Löve	42
<i>Ionopsidium savianum</i> (Caruel) Ball ex Arcang.	42
H_key species	42
BIBLIOGRAFIA	45

Abstract

This manual aims at giving information on two key aspects related to the *ex situ* conservation of spontaneous species: i) the germplasm collection and ii) the different *ex situ* conservation methods. Reported information, both general as well as specific of the different species target of the project, was obtained from bibliographic review and from the results of previous long-term experiences carried out at the Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences of the Università degli Studi di Perugia.

Ex situ conservation refers to those forms of conservation outside the natural habitat where the target species lives; this type of conservation is often carried out in genebanks. Beside ensuring the long-term protection of the species, the materials conserved *ex situ* can be the object of multiplication activities so that to generate useful material for reintroduction *in situ*. One of the most relevant aspects regarding *ex situ* conservation is the ability to intercept and conserve the highest possible diversity (i.e. the highest number of different alleles). Considering that genetic diversity level and organization differ strongly between prevalently allogamous (i.e. cross pollinating), autogamous (i.e. self-pollinating) and vegetative propagated species, the knowledge of the reproductive biology, and of other aspects related to the populations dynamic, is of paramount importance to put in place effective conservation strategies.

In Section 1, the best practices for the choice of sampling stations and of sampling methods of spontaneous plant species are thus described with respect to the species reproductive biology. General information is also provided on the methods of germplasm collection considering the peculiar characteristics of the target populations. Other aspects related to the preparation and management of collection documentation and to the equipment necessary for field collections are also addressed. Best practices for spontaneous species germplasm collection are finally summarized. Generally considered in the first part of this section, those aspects are then specifically analysed for the 5 species target of the project (i.e. *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann, *Iris marsica* I. Ricci & Colas., *Adonis distorta* Ten, *Klasea lycopifolia* (Vill.) Á.Löve et D.Löve and *Ionopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang.) and for the H-key species; due to the limited information available in the bibliography, a lower level of details is reported for the latter group.

In Section 2 information on the different *ex situ* conservation techniques, also in relation to the type of conserved material (e.g. whole or parts of the plant), on genebank organisation as well as on the aspects related to accessions characterization, evaluation, multiplication and regeneration is provided. Then, aspects related to characterisation-data management and exchange are described. Following the same structure of Section 1, information specific for the 5 target species and the H-key species, that are the exact object of the project, are provided.

SEZIONE 1 - RACCOLTA DEL GERMOPLASMA DI SPECIE SPONTANEE

Premessa

Questo manuale si basa sulla raccolta di materiale bibliografico derivante da una serie di altri testi e manuali, tra i quali in particolare: Guarino et al. (1995), Bacchetta et al. (2006, 2014) e ENSCONET (2009), integrati sulla base dell'esperienza, dei test di campo e di laboratorio e delle verifiche effettuate dal gruppo di lavoro.

Introduzione

Al fine di attuare efficaci strategie di conservazione è necessario conoscere la biologia delle specie da preservare in modo da programmare e portare a termine qualsiasi intervento volto alla loro salvaguardia. In particolare è necessario conoscere la biologia riproduttiva della specie di interesse e le sue dinamiche di popolazione perchè esse determinano la natura della variabilità genetica che può essere trovata.

Infatti quello che ha rilevanza per chi conserva è:

- la presenza di alleli diversi che condiziona in una specie e/o in una popolazione la sua possibilità di evoluzione;
- dove i diversi alleli possono esser ritrovati fra genotipi di una stessa popolazione, o fra popolazioni.

In sostanza è opportuno avere una adeguata conoscenza dei pool genici, cioè dell'insieme degli alleli presenti in tutti gli individui di una popolazione. L'andamento della variazione è diverso non solo fra specie prevalentemente allogame o prevalentemente autogame, ma dipende anche dal ciclo vitale (annuale, biennale o poliennale) della specie, dall'ecosistema in cui è inserita e dalla sua eventuale compromissione, dagli agenti impollinatori (vento, insetti, uccelli, etc.), dal tipo di sfruttamento a cui è soggetta e da chi viene utilizzata (uomo o animali). Ciò premesso, la conservazione della variabilità genetica si può attuare *in situ* ed *ex situ*.

Le specie selvatiche, dove possibile, vengono generalmente conservate nell'habitat che è loro proprio (conservazione *in situ*), spesso all'interno di aree protette (parchi nazionali, ZPS, ZSC, parchi naturali, riserve) che, quando ben gestite, dovrebbero garantirne, con una spesa relativamente limitata, la salvaguardia.

Per le specie selvatiche minacciate, oltre alla conservazione *in situ* è opportuno attuare anche strategie di conservazione *ex situ*, cioè al di fuori del loro habitat naturale, tali da favorire l'incremento numerico degli individui appartenenti alla specie in pericolo in luoghi predisposti a tale scopo (banche di germoplasma), per poi reimmetterli nell'ambiente naturale.

Bisogna notare che mentre la conservazione *in situ* si configura sempre come un tipo di conservazione dinamica, nel senso che le frequenze geniche sono lasciate libere di fluttuare in risposta alle pressioni selettive dell'ambiente, la conservazione *ex situ* si configura generalmente come un tipo di conservazione statica, in cui vengono mantenute le frequenze geniche che caratterizzano le popolazioni da conservare.

Le due strategie di conservazione, ove possibile, dovrebbero avere un ruolo complementare: da una parte la conservazione *in situ* dovrebbe garantire un continuo flusso di materiale per la conservazione *ex situ*, dall'altra le collezioni *ex situ* dovrebbero fornire sicurezza di conservazione alle specie o alle popolazioni che corrono il rischio di estinzione nel luogo di adattamento.

Obiettivi della raccolta

Una collezione di germoplasma dovrebbe contenere tutta la variabilità genetica di una specie in un territorio e quindi essere finalizzata alla raccolta dell'intero pool genico di questa. Ovviamente l'obiettivo generale si concretizza attraverso una collezione che deve tendere ad esser completa, collezionando la diversità genetica di più popolazioni di una specie in un dato territorio.

La collezione è finalizzata alla conservazione dei campioni a lungo termine in banche di germoplasma; questi possono quindi essere utilizzati nella ricerca, nella reintroduzione, nel rafforzamento delle popolazioni deboli e nel ripristino o restauro di habitat.

Criteri per il campionamento

Prima di organizzare una spedizione per la raccolta del germoplasma in un dato territorio è necessario reperire conoscenze riguardo il numero, la consistenza e la distribuzione delle popolazioni della specie target, la sua area geografica di distribuzione e la relativa caratterizzazione ecologica (caratteristiche pedo-climatiche e topografiche dei vari siti), e il suo habitat biologico.

Scelta delle stazioni di raccolta

Il primo indicatore per la scelta delle stazioni di raccolta è la distribuzione, il numero e la consistenza di popolazioni della specie target.

Se la specie è stata segnalata in numerose stazioni, si può iniziare con il campionamento di un numero di popolazioni non inferiore al 50% scegliendo tra le stazioni più diverse; se invece l'entità è rara e/o si è a conoscenza di un numero limitato di stazioni, si dovrebbero campionare tutte le popolazioni presenti (Bacchetta et al., 2006).

Criteri di scelta delle stazioni

Nel caso in cui la specie da campionare sia stata segnalata in diverse stazioni, i criteri di scelta di queste ultime si devono fondare su parametri stazionali come la distanza geografica interpopolazione, l'altitudine, il clima e gli habitat in modo da poter valutare in termini di diversità le stazioni e procedere alla scelte di quelle più diverse tra loro.

In particolare si dovranno considerare le seguenti caratteristiche per valutare la differenza tra stazioni:

- clima e sua variabilità, con particolare attenzione sul microclima,
- temperatura e distribuzione geografica e regionale,
- topografia (altitudine, inclinazione, esposizione, etc.) e suoi effetti su vegetazione,
- caratteristiche della vegetazione naturale,
- tipi di terreno e regime di umidità,
- isolamento della popolazione;
- dati da spedizioni precedenti.

Metodi di campionamento

Criteri di scelta delle popolazioni

Le strategie di campionamento di una popolazione dipendono dall'estensione della variabilità genetica all'interno della popolazione e dalla diversità esistente tra le differenti popolazioni. La sfida principale quindi sarà quella di selezionare popolazioni da campionare che massimizzino la diversità genetica (Neel e Cummings, 2003; Groves, 2003).

Come regola generale le popolazioni che hanno un'alta diversità sono geneticamente più eterogenee e meritano pertanto di essere campionate più ampiamente.

Per iniziare un efficace campionamento sarebbe opportuno campionare almeno cinque popolazioni (Falk and Holsinger, 1991) presenti nell'area geografica dove è distribuito il *taxon* scelto. Infatti dati provenienti dal campionamento di cinque popolazioni di quattro taxa rari a livello mondiale mostrano come in tal modo si arrivi

a coprire il 67-83% di tutti gli alleli (Neel e Cummings, 2003); tuttavia, salvo il caso di specie con pochissime popolazioni, il targeting di sole cinque popolazioni non fornirà una copertura completa della diversità genetica. Nel caso in cui esistano più popolazioni all'interno di una stessa stazione potrà essere campionata solo una di queste nel caso in cui altre popolazioni siano presenti in altri siti. Viceversa, nel caso in cui le stazioni di raccolta siano in numero esiguo è necessario campionare più di una popolazione per sito, se presenti. La scelta delle popolazioni da campionare dipenderà soprattutto dalle barriere genetiche tra queste, che sono influenzate:

- dal grado di dispersione del polline, che trasportato dal vento o dagli animali può percorrere distanze molto grandi
- dal grado di dispersione dei semi, dei frutti e dei propaguli che di solito non è superiore ai 100 m (Cain et al., 2000) ma può presentare rilevanti eccezioni, come nel caso di numerose specie di Asteraceae i cui acheni siano dotati di adattamenti al trasporto ad opera del vento.

Come approccio pratico, e quando non si hanno informazioni sufficienti riguardo il grado di dispersione della specie e/o il suo livello di distribuzione, il limite tra due popolazioni adiacenti potrebbe essere arbitrariamente stabilito come l'assenza di individui nei territori che le separano, su una distanza di 10 km (ENSCONET, 2009). Inoltre, all'interno delle popolazioni, potrebbero esserci differenze genetiche dovute a variazioni ecologiche all'interno dell'habitat. Mantenere separata questa variazione ecotipica attraverso un campionamento stratificato potrebbe essere importante nei programmi di conservazione e reintroduzione, mantenendo separati i campioni della raccolta.

Scelta del numero di individui da campionare

Come regola generale, i collezionisti dovrebbero mirare a campionare il maggior numero possibile di individui, senza mettere in pericolo la popolazione. Il tipo di raccolta più valido è quello che indica la scelta dei campioni in modo randomizzato, evitando di raccogliere da piante su cui l'attenzione si soffermi per caratteristiche che paiono interessanti.

Marshall e Brown (1975) raccomandano un campionamento che permetta la cattura di un'elevata diversità genetica attraverso il campionamento di almeno una copia del 95% degli alleli presenti in una popolazione con frequenza maggiore al 5%. Questo dovrebbe essere assicurato attraverso la raccolta di semi o di altro materiale vegetale da circa 50-100 genotipi (piante) scelti casualmente nel caso di entità a fecondazione allogama e autogama (Brown e Marshall, 1995; Guarino, 1995). Per le popolazioni molto grandi è meglio collezionare fino a 200 individui (Marshall e Brown, 1983)

Nel caso in cui la biologia riproduttiva della specie target non sia nota sarebbe auspicabile campionare, quando possibile, almeno il 50% di individui della singola popolazione (Bacchetta et al, 2006).

Nel caso in cui si verifichi che la popolazione naturale sia caratterizzata da sotto-popolazioni, queste andranno a loro volta individuate e le piante appartenenti a ciascuna di esse raccolte in maniera randomizzata. La raccolta casuale implica, infatti, che ogni singola pianta presente nella popolazione abbia la stessa probabilità di essere inclusa nel campione (Marshall e Brown, 1983).

In linea generale si può scegliere di campionare seguendo le linee di transetto, decidendo a priori la distanza minima che deve esserci tra le piante da campionare, evitando di concentrare il prelievo in uno spazio troppo ravvicinato con individui in stretto rapporto gli uni con gli altri (Brown e Marshall, 1995; Guarino et al, 1995). Un'indicazione generale di raccolta per ottenere un campione casuale potrebbe essere la seguente: lungo dei transetti immaginari disposti attraverso tutta la popolazione raccogliere seme da almeno 50 piante distanti l'una dall'altra almeno tre metri.

Per molte specie che pure si propagano per seme, ma che preferenzialmente si propagano vegetativamente, vengono spesso raccolti altri tipi di materiali di propagazione quali piante intere, radici, tuberi, bulbi etc. Questo tipo di collezioni presenta alcune difficoltà in più rispetto a quelle di semi perchè:

- la raccolta è più laboriosa essendoci la necessità di tirar fuori dalla terra tale materiale di propagazione;
- è difficile ritrovare le piante se ormai le foglie si sono seccate;
- il materiale è più ingombrante e perciò ci sono più difficoltà per trasportarlo;
- spesso si hanno perdite di vitalità del materiale;
- è più difficile raccogliere in modo randomizzato.

In natura queste popolazioni possono essere costituite da genotipi che si possono essere propagati vegetativamente su un vasto areale. È necessario pertanto campionare individui che non siano troppo vicini e comunque fare attenzione ai fenotipi evitando di raccogliere quelli che hanno caratteristiche molto simili. In proposito può essere suggerita la seguente strategia di raccolta:

- raccogliere un solo propagulo da almeno 10-15 genotipi presi separatamente. Nel caso di specie erbacee che propagano vegetativamente è più importante fermarsi a raccogliere in più luoghi possibile piuttosto che raccogliere un più grande numero di genotipi nella stessa area;
- nell'area di collezione bisogna raccogliere su di una superficie più vasta di quella che si userebbe per una popolazione propagata per seme, allo scopo di evitare di collezionare duplicati dello stesso clone;
- quando possibile raccogliere anche semi, dando ad essi un numero di raccolta diverso, ma annotando la loro connessione con i singoli materiali di propagazione.

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

La collezione di semi è "l'arte del possibile", in quanto la quantità del materiale raccolto ha implicazioni genetiche sull'evoluzione della popolazione campionata.

Infatti la sopravvivenza della maggior parte delle popolazioni vegetali annuali dipende dalla disponibilità di semi di un anno disponibili per gli anni successivi.

Al fine di ridurre al minimo i rischi per la sopravvivenza delle popolazioni vegetali, e in particolare nel caso di specie a rischio o presenti in piccole popolazioni, è necessario raccogliere non più del 20% del totale dei semi maturi disponibili il giorno della raccolta (Way, 2003). Inoltre, sono da evitare le raccolte ripetute su piante della stessa popolazione per due anni consecutivi, anche se Guerrant et al. (2004) suggeriscono di effettuare campionamenti con un basso numero di semi su più stagioni.

In generale un campione dovrebbe essere costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., 1995; ENSCONET, 2009). Tali valori sono indicativi perché la biologia di ciascuna specie e la variabilità che si osserva nella popolazione spesso suggeriscono strade alternative.

Ad esempio, in specie che hanno pochi semi per frutto per avere un campione di almeno 2500 semi è giocoforza raccogliere da più individui dei 50-100 indicati. Al contrario, in specie che hanno molti semi per frutto è sufficiente raccogliere solo parte della infruttescenza.

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo di dispersione dei semi, registrando come accessioni differenti ogni singola raccolta. La longevità di un campione di semi che perviene alla banca del germoplasma è fortemente determinata dalla loro qualità al momento della raccolta, soprattutto nei semi cosiddetti "ortodossi" (Bacchetta, 2006). L'ideale sarebbe prelevare lo stesso numero di semi (o di frutti) da ogni pianta campionata, allo stesso grado di maturazione, immediatamente prima della disseminazione.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Prima di procedere alla raccolta del seme è necessario verificare la presenza di semi vuoti o immaturi, separando i frutti e schiacciando o aprendo un piccolo numero di semi.

Metodi più veloci di valutazione riguardano la facilità con cui i frutti o i semi possono essere staccati dalla pianta. Anche i cambiamenti di colore dei frutti possono segnalarne la maturità. Generalmente non si devono raccogliere frutti e semi molto immaturi. Tuttavia, a volte può essere possibile (o necessario) raccogliere frutti leggermente immaturi (ancora abbastanza verdi) e farli maturare in laboratorio mantenendo i frutti in condizioni di sufficiente umidità ed esponendoli alla luce fino al raggiungimento della maturità. Questo approccio è risultato particolarmente utile per le specie con capsule di semi esplosive. Per maggiori dettagli: MSBP Technical Information Sheet No. 2 e 3.

Nel caso in cui ci siano sufficienti semi atti alla raccolta, può essere seguito il seguente protocollo:

- conservare i semi maturi e asciutti in sacchetti di carta o di cotone oppure,
- conservare i semi interi, contenuti ancora nei frutti, in buste di carta oppure,
- conservare i frutti carnosì direttamente in sacchetti di plastica e favorirne l'aerazione.

Per le entità molto rare e/o minacciate, ripetere la raccolta in due anni successivi, per avere la sicurezza di raccogliere materiale in quantità idonea senza danneggiare la popolazione, oppure eseguire più campionamenti in uno stesso anno (Bacchetta et al., 2006).

La quantità ideale di semi vitali da raccogliere dovrebbe essere tale da consentire che:

- un campione rappresentativo possa essere conservato nella banca a lungo termine;
- ci siano semi sufficienti per avviare i test di germinazione e di vitalità;
- il monitoraggio della vitalità possa essere effettuato periodicamente dalla banca durante la conservazione.

Le tecniche di raccolta vanno scelte in base alla specie oggetto del campionamento. Nello specifico si può:

- raccogliere i semi dai frutti deiscenti (come silique, baccelli o capsule) direttamente in un sacchetto di carta;
- tagliare le intere infiorescenze o parti di esse e porle in sacchetti;
- raccogliere i frutti carnosì più grandi uno per uno, mettendoli in sacchetti tenendoli aperti per permettere l'aerazione;
- scuotere le piante e raccogliere semi o frutti deiscenti su un pezzo di tessuto posto a terra sotto di esse e poi versare i semi in sacchetti di raccolta;
- in alcune circostanze, quando le piante non producono semi al momento della visita, è possibile raccogliere piante intere per farle crescere in condizioni controllate fino alla maturazione del seme (Chorlton et al., 2003). Ovviamente, questo è consigliato solo dove vi siano specifiche autorizzazioni a questo tipo di prelievo e dove non venga minacciata la sopravvivenza futura della popolazione.

Inoltre si deve evitare di:

- raccogliere frutti o semi già caduti a terra, perché i semi possono essere vecchi e probabilmente deteriorati ed in aggiunta potrebbero non appartenere all'individuo target del campionamento;
- toccare i frutti delle orchidee con le mani (o anche con i guanti), ma usare un rasoio per tagliare il pedicello per far cadere i frutti direttamente in un sacchetto. Per questo gruppo, è opportuno prestare particolare attenzione alle manipolazioni successive perché i semi sono estremamente piccoli (ENSCONET, 2009).

Per maggiori dettagli: MSBP Technical Information Sheet No. 3.

Protocollo per popolazioni di dimensioni estremamente ridotte

Quando una popolazione è molto piccola (meno di 100 individui), se vi è materiale sufficiente e la raccolta non pregiudica in alcun modo il futuro della specie, è opportuno tenere separata la raccolta da ogni pianta, utilizzando una busta diversa per ognuna. Nella scheda di raccolta deve essere riportato il numero di lotti e l'indicazione di trattare separatamente il materiale contenuto in ogni busta. Questo contribuisce alla conservazione della diversità genetica della popolazione. Tale situazione si riscontra con una certa facilità quando si lavora con *taxa* endemici o a rischio di estinzione, la cui distribuzione è limitata a stazioni puntiformi (Bacchetta et al., 2006).

Documentazione sulla raccolta

Le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto includono: nome dell'istituto che opera il collezionamento, numero di accessione, collezionista, data di raccolta, nome scientifico e nome comune della specie collezionata, famiglia, informazioni sulla località, latitudine e longitudine, caratteristiche del sito di raccolta, informazioni sulla popolazione (numero totale di individui, numero di individui in riproduzione e numero di individui campionati). Questi e altri dati devono essere inseriti in apposite schede funzionali alla raccolta di germoplasma (per maggiori dettagli si veda Bacchetta et al., 2014).

La caratterizzazione delle popolazioni è uno strumento base per la diagnosi del loro stato, per la stima della variabilità futura (García, 2002) nonché per la programmazione e gestione della conservazione *in situ*. Lo studio in campo delle popolazioni prevede l'acquisizione di una serie di informazioni e dati specifici che permettono la conoscenza dell'autoecologia di un *taxon*.

Per garantire la confrontabilità e omogeneità dei dati raccolti dalle diverse banche, sono state predisposte delle schede di campo la cui compilazione consente di raccogliere ed elaborare i dati relativi alle stazioni dei *taxa* di interesse (Bacchetta et al., 2014). Ogni qualvolta viene eseguita una indagine specifica deve essere compilata la scheda relativa.

Equipaggiamento per la raccolta del germoplasma

Le attrezzature ed i materiali necessari per le attività di campo sono in gran parte assimilabili a quelli normalmente utilizzati in altre ricerche di tipo sperimentale e per tutte le pratiche outdoor di carattere naturalistico. Di seguito viene specificato un elenco delle attrezzature utili per la raccolta del materiale, dei dati e di qualsiasi altro elemento che si renda necessario (Bacchetta et al., 2006):

- permessi e autorizzazioni alla raccolta
- quaderno di campo
- registratore vocale
- schede di campo
- PC palmare, tablet o notebook
- sacchetti di cotone oppure buste di carta di varie dimensioni
- sacchetti in polietilene di varie dimensioni
- barattolini in plastica (per catturare eventuali parassiti, impollinatori e bottinatori)
- bustine da filatelia trasparenti e traspiranti
- nastro adesivo, elastici
- etichette e cartellini da inserire nelle singole buste
- alcool denaturato 95° e glicerina
- formaldeide al 30% per la raccolta di materiale vivo

- flore locali e nazionali
- altimetro/barometro
- termometro
- igrometro
- clinometro
- pHmetro
- GPS o dGPS
- guanti da giardiniere o in lattice e mascherine
- lenti d'ingrandimento a 3x, 6x o 10x
- lamette/bisturi
- vetrini e portaoggetti
- coltellino/forbici da potatura
- trivella/piccozza/paletta/piccone
- attrezzatura da arrampicata (caschi, corde, imbraghi, discensori, moschettoni, etc.)
- matite/penne/gomme
- fotocamera
- binocoli
- fogli di giornale/tamponi/prensa da campo
- vasi in plastica
- gel di silice per conservare il materiale per gli studi di biologia molecolare

In sintesi

In base alle precedenti considerazioni, vengono di seguito riportate in sintesi le buone pratiche da seguire per la raccolta del germoplasma di specie spontanee:

- Tenere presenti i diversi parametri stazionali (altitudine, esposizione, suolo, pendenza, ombreggiamento) per scegliere le popolazioni da campionare.
- Campionare, quando possibile, non meno di 5 popolazioni per area ecogeografica omogenea.
- Campionare, se fattibile, circa il 50 % di individui per ogni popolazione di cui non si conosca la biologia riproduttiva.
- Campionare, se fattibile, circa 50-100 individui per ogni popolazione di cui si conosca la biologia riproduttiva.
- Campionare in maniera casuale, ma tenendo distinte le metapopolazioni se l'habitat risulta eterogeneo.
- Campionare sufficienti semi (preferibilmente 5000) o materiale vegetale per ogni individuo vegetale al fine di assicurarne una rappresentatività soddisfacente.
- Non raccogliere mai più del 20% dei semi disponibili il giorno in cui si è in campo. Questo assicura che la popolazione o sotto-popolazione non venga danneggiata da una raccolta eccessiva.
- Per i taxa presenti in un ampio spettro di situazioni ecologiche incrementare il numero delle popolazioni o delle sotto-popolazioni da campionare, tenendo distinte le une dalle altre.
- Per i taxa presenti solo in un ristretto ambito geografico, incrementare il numero di individui per ogni sito e il numero dei propaguli per ogni individuo
- Per i taxa molto rari di cui è impossibile campionare un numero elevato di individui procedere con la raccolta in più stazioni, prelevando un maggior quantitativo di germoplasma dalla singola pianta.
- La sicurezza futura della popolazione della specie vegetale target è fondamentale.

SEZIONE 1 - PROTOCOLLI PER LA RACCOLTA DI GERMOPLASMA DELLE 5 SPECIE TARGET E DELLE H-KEY SPECIES PRESENTI IN UMBRIA

Obiettivi della raccolta

La collezione di germoplasma delle 5 specie target (*Himantoglossum adriaticum* H. Baumann, *Serratula lycopifolia** (Vill.) Á.Löve & D.Löve, *Iris marsica* I.Ricci & Colas., *Ionopsidium savianum* (Caruel) Arcang., *Adonis distorta* Ten.) e delle H-Key species presenti in Umbria si prefigge lo scopo di contenere tutta la variabilità genetica di queste specie nel territorio e quindi è finalizzata alla raccolta dell'intero pool genico di queste specie in questo territorio. Ovviamente l'obiettivo generale si concretizza attraverso collezioni che devono tendere ad essere complete, attraverso il prelievo da più popolazioni.

La collezione è finalizzata alla conservazione dei campioni a lungo termine nella Banca di Germoplasma del DSA3 dell'Università degli Studi di Perugia (FAO Code: ITA363), che potranno essere utilizzati nella ricerca, nella reintroduzione, nel rafforzamento delle popolazioni deboli e nel restauro di habitat, come previsto dai Piani di Azione in corso di stesura nell'ambito delle Azioni A10 e A11 del LIFE IMAGINE.

Himantoglossum adriaticum H. Baumann

Criteri per il campionamento

Prima di organizzare una spedizione per la raccolta del germoplasma in un dato territorio è necessario reperire conoscenze riguardo il numero, la consistenza e la distribuzione delle popolazioni della specie target, la sua area geografica di distribuzione e la relativa caratterizzazione ecologica (caratteristiche pedo-climatiche e topografiche dei vari siti), e il suo habitat biologico. A tal proposito, *H. adriaticum* è presente in un'ampia gamma di habitat, da praterie mesiche a boscaglie aride e praterie secondarie aride, prediligendo zone ecotonali semi-ombreggiate quali zone marginali di habitat secondari artificiali (bordi stradali) o soggetti a successione secondaria (vigneti e praterie abbandonate), che spesso ospitano popolazioni consistenti della specie (Bódis et al., 2018). Nuovi dati relativi a questi aspetti sono stati raccolti ed elaborati nell'ambito dell'Azione A11 e utilizzati per la produzione della Milestone "Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species" (Gigante et al., 2021a).

Scelta delle stazioni di raccolta

Il primo indicatore per la scelta delle stazioni di raccolta è la distribuzione, il numero e la consistenza di popolazioni della specie target.

In Umbria la specie è attualmente segnalata in 197 punti di presenza, 132 ricadenti in provincia di Perugia, 64 in territorio ternano (Gigante et al., 2021a).

Il campionamento della specie, segnalata in numerose stazioni, può iniziare considerando un numero di popolazioni non inferiore al 50% scegliendo quelle presenti nelle stazioni più diverse.

Criteri di scelta delle stazioni

I criteri di scelta delle stazioni dove campionare *H. adriaticum* si devono fondare su parametri stazionali come la distanza geografica fra popolazioni, l'altitudine, il clima e gli habitat biologici della specie, in modo da poter valutare in termini di diversità le stazioni e procedere alla scelta di quelle più diverse tra loro.

In particolare si dovranno considerare le seguenti caratteristiche per valutare la differenza tra stazioni:

- clima e sua variabilità, particolare attenzione sul microclima,

- distribuzione geografica e regionale,
- topografia (altitudine, inclinazione, esposizione, etc.) e suoi effetti su vegetazione,
- caratteristiche della vegetazione naturale,
- tipi di terreno e regime di umidità,
- isolamento della popolazione;
- dati da spedizioni precedenti.

La maggior parte dei siti di presenza di *H. adriaticum* in Umbria rientrano nel Macrobioclima Temperato a Variante Bioclimatica Submediterranea, ad eccezione di alcuni punti relativi alle aree del Lago Trasimeno e del narnese e delle stazioni in località Monte Orve e Piano di Annifo. Dal punto di vista geologico la specie si rinviene su un'ampia varietà di substrati, prevalentemente su litotipi di natura calcarea, in particolare scaglia rossa, mentre il range altitudinale di *H. adriaticum* va da un minimo di 124 m s.l.m. ad un massimo di 1.319 m s.l.m, con le quote più basse registrate nel narnese e la più elevata relativa al M. La Pelosa (Gigante et al., 2021a). Nel territorio regionale *H. adriaticum* si rinviene in 9 tipologie diverse di habitat, principalmente su praterie secondarie aride e in ambienti antropizzati quali margini di strade asfaltate e di sentieri sterrati, secondariamente lungo margini boschivi, oliveti e aree soggette a fenomeni di successione secondaria (Gigante et al., 2021a).

I criteri di scelta delle stazioni in cui eseguire il campionamento dovrebbero necessariamente includere la distanza geografica, la diversità di condizioni mesoclimatiche (5 classi), le diverse altitudini (3 classi), i diversi habitat biologici (9 tipologie). Considerando l'impossibilità di avere stazioni che rappresentino tutte le combinazioni delle caratteristiche sopra enunciate, verosimilmente si ritiene che un campionamento ottimale delle popolazioni presenti dovrebbe includere almeno 20 stazioni.

Metodi di campionamento

Criteri di scelta delle popolazioni

Generalmente *H. adriaticum* si presenta in nuclei di pochi individui (oltre il 60% delle popolazioni è costituito da 1-10 individui), ma eccezionalmente sono state individuate anche popolazioni costituite da più di cento esemplari (Gigante et al., 2021a).

All'interno di una stessa stazione solitamente possono essere campionate da una a più popolazioni, ma nella maggioranza delle stazioni umbre di *H. adriaticum* di fatto sono state osservate popolazioni singole composte di pochi individui. L'analisi della vicinanza geografica potrà condurre in alcuni casi all'accorpamento di più stazioni di rilevamento distinte in un'unica popolazione, in cui le stazioni vengano interpretate come sotto-popolazioni. La scelta delle popolazioni da campionare dipenderà soprattutto dalle barriere genetiche tra queste, che sono influenzate:

- dal grado di dispersione del polline, che trasportato dal vento o dagli animali può percorrere distanze molto grandi;
- dal grado di dispersione dei semi, dei frutti e dei propaguli che, nel caso in esame, può ritenersi congruente con quanto indicato da Cain et al. (2000) e quindi non superiore ai 100 m.

Come approccio pratico il limite tra due popolazioni adiacenti potrebbe essere arbitrariamente stabilito come l'assenza di individui nei territori che le separano su una distanza di 10 km (ENSCONET, 2009).

Nel caso di *H. adriaticum*, data l'esiguità numerica delle popolazioni, è improbabile rinvenire all'interno delle singole popolazioni differenze genetiche dovute a variazioni ecologiche all'interno dell'habitat.

Scelta del numero di individui da campionare

Dato che *H. adriaticum* è una specie prevalentemente allogama (Claessens e Kleynen, 2016), ed in Umbria è presente prevalentemente in popolazioni molto piccole (meno di 100 individui), è preferibile campionare il più alto numero di individui possibile.

Come la specie affine *Himantoglossum hircinum* (L.) Sprengel, *H. adriaticum* potrebbe propagarsi anche vegetativamente (Carey e Farrell, 2002), e al fine di un'ottimale campagna di raccolta, potrebbero essere raccolti altri tipi di materiali di propagazione quali piante intere o tuberi. Questo tipo di collezione però, oltre a presentare difficoltà in più rispetto a quella dei semi (come spiegato nella parte generale), presenta caratteristiche distruttive e pertanto verrà riservata solo al reperimento di materiale in vivo da coltivare e conservare nell'Orto Botanico dell'Università degli Studi di Perugia.

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

Considerato che, come indicato nella parte generale, un campione rappresentativo dovrebbe esser costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., 1995; ENSCONET, 2009), nel caso di *H. adriaticum* questi valori possono essere facilmente raggiunti. Infatti, anche se il tasso di fruttificazione di questa specie è generalmente basso, compreso tra il 10 e il 30% (Bódis et al., 2019), ogni frutto (capsula) contiene in media 10686 ± 1550 semi (Sonkoly et al., 2016).

Va tuttavia considerato che, malgrado l'elevata prolificità, i semi delle orchidee in generale presentano livelli bassissimi di germinabilità in quanto richiedono al momento dello sviluppo la presenza di funghi simbiotici: le plantule di orchidee utilizzano infatti funghi micorrizici per l'assorbimento del carbonio e dei nutrienti, l'effetto di promozione della crescita dei simbiotici sulle plantule è ampiamente accettato così come il ruolo fondamentale degli endofiti nell'attecchimento delle plantule (Rasmussen, 2002; Dearnaley, 2007; Pecoraro et al., 2013).

Recenti indagini (Slaviero et al., 2016) hanno evidenziato per questa specie una capacità germinativa molto bassa sia in termini di percentuale di semi germinati (<3%) che di percentuale di embrioni ($\leq 5\%$); la proporzione di semi non fertili è risultata molto alta (> 40% di semi con embrione ridotto o assente). La specie ha inoltre mostrato una tendenza nettamente diversificata in base alla struttura della vegetazione presente nell'habitat biologico di rinvenimento, evidenziando performance migliori in ambienti aperti (con minor quantità di seme ma di migliore qualità) rispetto a situazioni con vegetazione chiusa (Slaviero et al., 2016).

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

In *H. adriaticum* i fiori compaiono tipicamente tra fine maggio ed inizio giugno; le capsule maturano in 4-6 settimane, e la dispersione dei semi avviene piuttosto rapidamente. In base alle indagini svolte in Umbria per l'Azione A11 (Gigante et al., 2021a), si è osservato che generalmente la maturazione dei semi avviene verso la metà di giugno (o anche prima, dipendentemente dall'andamento meteorologico stagionale), benché fonti di letteratura riportino il periodo luglio-agosto (Bódis et al., 2019).

Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo in cui avviene la maturazione delle capsule. La longevità di un campione di semi che perviene alla banca del germoplasma è fortemente determinata dalla loro qualità al momento della raccolta soprattutto nei semi cosiddetti "ortodossi" (Bacchetta, 2006). L'ideale sarebbe prelevare lo stesso numero di semi (o di frutti) da ogni pianta campionata, allo stesso grado di maturazione, immediatamente prima della disseminazione.

Popolazioni di dimensioni estremamente ridotte

Quando una popolazione è molto piccola (meno di 100 individui), come nel caso della maggioranza delle popolazioni umbre di *H. adriaticum*, è opportuno tenere separata la raccolta da ogni individuo, utilizzando una busta diversa per ognuno. Nella scheda di raccolta deve essere riportato il numero di lotti e l'indicazione di trattare separatamente il materiale contenuto in ogni busta. Questo contribuisce alla conservazione della diversità genetica della popolazione. Considerato che ciascun individuo di *H. adriaticum* generalmente produce un numero molto elevato di capsule (spesso intorno a 50), è possibile eseguire la raccolta prelevando materiale sufficiente senza pregiudicare in alcun modo il futuro delle popolazioni; a tal fine, sarà sufficiente prelevare 3 o 4 capsule da ciascun individuo, prediligendo quelle basali del racemo che saranno le prime a maturare.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Il protocollo per la raccolta dei semi e le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto non differiscono da quelli generali utilizzabili per molteplici specie.

***Iris marsica* I. Ricci & Colas.**

Criteria per il campionamento

La conoscenza della distribuzione e dell'ecologia di *Iris marsica* I. Ricci & Colas è necessaria per l'organizzazione di una spedizione per la raccolta del germoplasma in un determinato territorio.

I. marsica è presente in pascoli, pendii rupestri, praterie, arbusteti e radure boschive, variamente esposti ed inclinati, su substrati calcarei, a quote comprese tra gli 825 ed i 1.800 m s.l.m. (Stinca et al., 2016). In particolare, in Umbria, è stata rilevata in praterie montane e collinari, spesso su tasche di suolo su affioramenti rocciosi, orli, radure e margini in contatto con formazioni arbustive a ginepro rosso o boscaglie di caducifoglie collinari (carpino nero, cerro, roverella), tra 700 e 1.400 m s.l.m. (Gigante e Maneli, 2017). Nuovi dati relativi a questi aspetti sono stati raccolti ed elaborati nell'ambito dell'Azione A11 e utilizzati per la produzione della Milestone "*Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species*" (Gigante et al., 2021b).

Scelta delle stazioni di raccolta

Per un'efficace scelta delle stazioni di raccolta è necessario conoscere la distribuzione, il numero e la consistenza delle popolazioni della specie target nel territorio di interesse.

I. marsica costituisce un endemismo dell'Italia centrale ed è segnalato per le Regioni amministrative Marche, Umbria, Lazio, Molise e Abruzzo (Bartolucci et al. 2018).

In Umbria la specie è attualmente segnalata in 9 punti di presenza, 8 ricadenti in provincia di Perugia, 1 in territorio ternano (Gigante et al., 2021b). La presenza ad oggi documentata di *I. marsica* è avvenuta solo per 3 stazioni umbre: il versante sud-ovest del Monte Maggio (Loreti, 1986; Cagiotti et al., 1992), il Parco Naturale Regionale del Monte Cucco (Salerno e Puleti, 1994) e il Monte Eremita (Gigante e Maneli, 2017), mentre 6 sono di nuova segnalazione (Gigante et al., 2021b); nel corso dei lavori di campionamento per l'Azione A10 di questo Progetto, nel giugno 2022 è stata rinvenuta un'ulteriore stazione sul M. Pizzuto presso Civita di Cascia, in corso di approfondimento. Per queste stazioni si può presupporre la presenza di *I. marsica* solo su base morfologica. Nell'ambito del presente progetto sono previste analisi genetiche al fine di fare chiarezza sull'effettiva identità della/e specie di *Iris* presente/i sui massicci appenninici umbri. Al momento si ritiene opportuno mantenere l'attribuzione alla specie *I. marsica*, nell'attesa di poter approfondire gli aspetti tassonomici nel corso dell'Azione A11 e delle successive (Gigante et al. 2021b).

Dato che la specie è stata segnalata in un ridotto numero di stazioni, il campionamento ottimale sarà effettuato in tutti i siti di presenza.

Metodi di campionamento

Criteri di scelta delle popolazioni

Generalmente *I. marsica* forma colonie di dimensione variabile, che occupano lo spazio in modo disomogeneo: alcune stazioni sono caratterizzate da un numero elevato di individui collocati in un'area circoscritta, altre sono popolate da numerose piccole colonie dislocate su una superficie più ampia (Gigante et al., 2021b).

All'interno delle stazioni in cui sono presenti colonie localizzate in un'area circoscritta (Monte Eremita, Monte Maggio e Monti Martani - PEL) è consigliato il campionamento di individui appartenenti a quelle colonie poste a maggiore distanza, nel caso in cui le colonie siano nettamente distinguibili e definendo queste colonie come sotto-popolazioni della specie presente nell'area. Se la distinzione di sotto-popolazioni non fosse possibile, si procederà al campionamento considerando gli individui presenti come appartenenti a un'unica popolazione. Nelle stazioni in cui *I. marsica* forma piccole colonie molto circoscritte e di piccole dimensioni, ma dislocate su una superficie più ampia (Monti Martani - VAL, Monte Solenne e Monte Maggiore) è consigliato il campionamento di individui appartenenti a quelle colonie poste a maggiore distanza.

La scelta delle popolazioni e sotto-popolazioni da campionare dipenderà soprattutto dalle barriere genetiche tra queste, rappresentate:

- da un range altitudinale relativamente ampio (MAR, AME, CUC);
- dalla diversa esposizione in cui si trovano;
- dal grado di dispersione del polline, che trasportato dal vento o dagli animali può percorrere distanze molto grandi;
- dal grado di dispersione dei semi, dei frutti e dei propaguli.

Dato che *I. marsica* ha un'elevata capacità di propagarsi per via vegetativa (rizomatosa), come approccio pratico il limite tra due sotto-popolazioni adiacenti potrebbe essere arbitrariamente stabilito come l'assenza di individui nei territori che le separano su una distanza di 500 m. Dove il numero di sotto-popolazioni sia elevato, il campionamento dovrebbe evitare il collezionamento di individui appartenenti a popolazioni che si siano vicine lungo il clinale, in quanto la popolazione al livello inferiore potrebbe derivare da rizomi provenienti da quella sovrastante caduti a causa del movimento del terreno potenzialmente dovuto alla sua rottura operata del calpestio o scavi di animali.

Scelta del numero di individui da campionare

Iris marsica presenta organi sotterranei modificati che consentono alla specie di riprodursi vegetativamente oltre che sessualmente e che influenzano profondamente la diversità intraspecifica e la produzione di cassule e semi (Colasante, 2014).

La biologia della specie e la numerosità e la distribuzione degli individui nelle stazioni di raccolta determinano il numero di individui minimo da collezionare per campionare il massimo della diversità genetica della specie. Anche la modalità di dispersione del seme incide sulla diversità. In particolare, *I. marsica* produce semi piuttosto pesanti la cui dispersione non implica alcun meccanismo specializzato, con una bassa capacità di dispersione (Di Musciano et al., 2020).

In Umbria *I. marsica* è presente prevalentemente in popolazioni con un numero elevato di individui, suddivisi in piccole sotto-popolazioni. Dato il sistema riproduttivo della specie sarà opportuno collezionare:

- 50-100 genotipi presi separatamente in un'unica popolazione se questa non è costituita da sotto-popolazioni, considerando tutta l'area occupata dalla popolazione evitando di raccogliere un più grande numero di genotipi nella stessa zona;
- 10-15 genotipi presi separatamente per ogni sotto-popolazione che si è scelto di campionare. Anche in questo caso è importante raccogliere genotipi il più lontano possibile tra loro.

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

Considerato che, come indicato nella parte generale, un campione rappresentativo dovrebbe esser costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino 1995 et al., ENSCONET, 2009), nel caso di *I. marsica* questi valori possono essere facilmente raggiunti. Infatti, ogni cassula contiene numerosi semi (Colasante, 2014) e il tasso di germinabilità risulta essere del 55%, ma dopo 180 giorni in piastra come evidenziato da prove effettuate nel corso del progetto LIFE FLORANET (LIFE 15 NAT/IT/000946). Va tuttavia considerato che nei siti umbri la specie sembra mostrare tassi di fruttificazione molto ridotti, malgrado l'elevato numero di individui vegetativi. Nel caso non fosse possibile prelevare seme, si potrebbe procedere al collezionamento di parti di pianta utili alla propagazione, ciascuno per ogni individuo selezionato per il collezionamento.

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

In *I. marsica* i fiori compaiono tipicamente tra fine maggio ed inizio giugno; la fruttificazione avviene tra la fine di giugno ed inizio luglio e la dispersione dei semi avviene da luglio ad agosto (Gigante et al., 2021b).

Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo in cui avviene la maturazione delle cassule. L'ideale sarebbe prelevare lo stesso numero di semi (o di frutti) da ogni pianta campionata, allo stesso grado di maturazione, immediatamente prima della disseminazione.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Il protocollo per la raccolta dei semi e le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto non differiscono da quelli generali utilizzabili per molteplici specie.

***Adonis distorta* Ten.**

Criteri per il campionamento

In Umbria *Adonis distorta* Ten. è presente sui Monti Sibillini vegetando su breccie e rupi calcaree, apici di alimentazione dei ghiaioni di alta quota con clasti piccoli e quasi privi di terriccio, dai 2000 ai 2500 m s.l.m. Nuovi dati relativi a questi aspetti sono stati raccolti ed elaborati nell'ambito dell'Azione A11 e utilizzati per la produzione della Milestone "*Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species*" (Gigante et al., 2021c).

Scelta delle stazioni di raccolta

Il primo indicatore per la scelta delle stazioni di raccolta è la distribuzione, il numero e la consistenza di popolazioni della specie target.

In Umbria la specie è attualmente segnalata nella stazione della Cima del Redentore, nel complesso montuoso del Monte Vettore, risultando l'unica località di presenza della specie in Umbria (Gigante e Maneli, 2017). Il campionamento della specie, quindi, dovrà procedere collezionando il maggior numero di individui che costituiscono la popolazione.

Metodi di campionamento

Scelta del numero di individui da campionare

A. distorta si riproduce per via gamica mediante impollinazione entomofila e disseminazione barocora (Stinca et al., 2016) ed è presente in Umbria in una popolazione costituita da circa 96.000 individui (Gigante et al., 2021c). Considerando la dimensione della popolazione, la distribuzione degli individui è preferibile campionare un numero elevato di individui, almeno 100, presi a caso considerando tutta la superficie di distribuzione della popolazione, seguendo le indicazioni di raccolta randomizzata descritte nella parte generale del protocollo. Inoltre, dato che, il progetto LIFE FLORANET (LIFE 15 NAT/IT/000946), attraverso studi sulla capacità di dispersione della specie realizzati attraverso simulazioni che hanno previsto l'utilizzo di diversi parametri quali: sindrome da dispersione, forma di crescita, velocità terminale, massa del seme e altezza di rilascio, ha dimostrato che *A. distorta* possiede una bassa capacità di dispersione (Di Musciano et al., 2020), è consigliato collezionare individui che lungo le linee del transetto siano il più lontano possibile, superando anche la distanza di 3 m definita nel protocollo generale.

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

In generale, un campione rappresentativo dovrebbe essere costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., ENSCONET, 2009), nel caso di *A. distorta*, questi valori devono essere aumentati. Ciò è dovuto a tassi di germinazione molto bassi o nulli e a una dormienza morfologica e fisiologica elevata dei semi (Frattaroli et al., 2013).

Inoltre, Frattaroli et al. (2013), nella raccolta di seme da popolazioni presenti nel Parco Nazionale della Majella necessaria per i già citati studi sulla geminazione, hanno ritenuto sostenibile raccogliere 300 semi a fronte di 1500 individui totali, dando una preziosa indicazione numerica riguardo alla quantità di seme da poter collezionare senza mettere a rischio le popolazioni. Nel caso della popolazione Umbra, grazie al numero elevato di individui che la compongono, è possibile aumentare il numero di semi da collezionare senza mettere in pericolo la popolazione stessa.

Aumentare il numero di semi è necessario in quanto, risultati emersi durante il progetto LIFE FLORANET (LIFE 15 NAT/IT/000946), derivati da prove effettuate seguendo differenti protocolli per test di germinabilità, hanno confermato la bassa capacità di germinazione di *A. distorta* (Di Cecco e Frattaroli, 2018).

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

In *A. distorta* i fiori compaiono tipicamente tra giugno e luglio, la fruttificazione avviene nei mesi di luglio e agosto, e la dispersione dei semi si verifica da agosto a settembre.

Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo in cui avviene la maturazione dei frutti.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Il protocollo per la raccolta dei semi e le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto non differiscono da quelli generali utilizzabili per molteplici specie.

***Klasea lycopifolia* (Vill.) Á.Löve et D.Löve**

Criteria per il campionamento

Klasea lycopifolia (Vill.) Á.Löve et D.Löve è presente in un'ampia gamma di habitat, quali praterie semi-aride collinari e montane, prati alpini, prati falciabili, margini forestali, megaforbietti, cespuglieti, boscaglie aperte, talora habitat umidi di pianura, a quote mediamente comprese tra 500-600 e 1.400, fino a 1.800 m s.l.m. (Pignatti, 1982; Abdulhak, 2010; Cantò, 2010; Gigante et al., 2014a). In Umbria *K. lycopifolia* è presente sui Monti Faeto e Pennino, a quote comprese tra 1.000 e 1.450 m, su substrato calcareo e suoli da mediamente a poco ricchi di scheletro (Ballelli et al., 2010; Ferri, 2010; Caruso, 2016; Gigante et al., 2014a). Nuovi dati relativi a questi aspetti sono stati raccolti ed elaborati nell'ambito dell'Azione A11 e utilizzati per la produzione della Milestone "*Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species*" (Gigante et al., 2021d).

Scelta delle stazioni di raccolta

Il primo indicatore per la scelta delle stazioni di raccolta è la distribuzione, il numero e la consistenza di popolazioni della specie target.

In Umbria la specie è attualmente segnalata in 2 punti di presenza ricadenti in provincia di Perugia (Gigante et al., 2021d). Nello specifico è presente due località nel complesso di Monte Pennino (Colle Grugnoleta e Colle Finiglia) e in una stazione sul Monte Faeto.

Dato che la specie è stata segnalata in un ridotto numero di località, il campionamento ottimale sarà effettuato in tutti i siti di presenza, considerando 3 stazioni.

Metodi di campionamento

Criteria di scelta delle popolazioni

K. lycopifolia si presenta in nuclei formati da molti a pochi individui mostrando una distribuzione discontinua. All'interno di una stessa stazione di raccolta devono essere campionate più sotto-popolazioni, che siano tra loro sufficientemente distanti. Se la distinzione di sotto-popolazioni non fosse possibile, si procederà al campionamento considerando gli individui presenti come appartenenti a un'unica popolazione.

La scelta delle popolazioni e sotto-popolazioni da campionare dipenderà soprattutto dalle barriere genetiche tra queste, rappresentate:

- da un range altitudinale relativamente ampio;
- dalla diversa esposizione in cui si trovano;
- dalla colonizzazione di aree con diversa inclinazione;
- dal grado di dispersione del polline, che trasportato dal vento o dagli animali può percorrere distanze molto grandi;
- dal grado di dispersione dei semi, dei frutti e dei propaguli.

Informazioni riguardo alla capacità di dispersione possono essere dedotte dalla morfologia del pappo che ha dimensioni ridotte rispetto all'achenio ed è a setole sottili. Questo ha permesso di ipotizzare che il principale sistema di disseminazione sia la barocoria (Gigante et al., 2021d) e che la dispersione dei frutti sia inferiore

rispetto ad altre *Asteraceae* con semi più leggeri e pappo di peli piumosi (Baksay, 1957; Abdulhak, 2010; Di Musciano et al., 2020).

Questi dati insieme a quelli rilevati nell'ambito del progetto LIFE "FLORANET" (LIFE 15 NAT/IT/000946) sulla capacità di dispersione di *K. lycopifolia* ottenuti attraverso simulazioni che hanno considerato la massa del seme e l'altezza di rilascio (Di Musciano et al., 2020; Di Cecco, 2016-2020) rinforzano l'ipotesi che la dispersione dei frutti sia limitata.

La bassa capacità di dispersione e l'elevata capacità di propagazione per via vegetativa (rizomatosa), permettono di definire praticamente il limite tra due sotto-popolazioni adiacenti, che in questo caso potrebbe essere arbitrariamente stabilito come l'assenza di individui nei territori che le separano su una distanza di 500 m. Inoltre, dato che il numero di sotto-popolazioni presenti nelle stazioni di raccolta è elevato, il campionamento dovrebbe evitare il collezionamento di individui appartenenti a popolazioni che si siano vicine lungo il clinale, in quanto la popolazione al livello inferiore potrebbe derivare da rizomi provenienti da quella sovrastante caduti a causa del movimento del terreno potenzialmente dovuto alla sua rottura operata dal calpestio o scavi di animali.

Scelta del numero di individui da campionare

Dato che per *K. lycopifolia* riproduzione può avvenire sia per via sessuale che per via vegetativa, attraverso rizomi sotterranei, interpretati come un probabile risultato della sua poliploidia (Baksay, 1957), e che in Umbria la specie è presente prevalentemente in popolazioni grandi costituite da diverse sotto-popolazioni di dimensione variabile, è preferibile campionare un numero ridotto di individui da più sotto-popolazioni sufficientemente lontane.

Dato il sistema riproduttivo della specie sarà opportuno collezionare quindi circa 10-15 genotipi presi separatamente per ogni sotto-popolazione che si è scelto di campionare. Anche in questo caso è importante raccogliere genotipi il più lontano possibile tra loro. Aumentare la distanza degli individui da campionare risulta determinante nella ricerca della diversità genetica all'interno della popolazione. Infatti in uno studio sulla diversità genetica di popolazioni di *K. lycopifolia* in Polonia, Slovenia e Ucraina effettuato attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari AFLP, Cieślak (2013) ha evidenziato che la diversità intra-popolazione della specie sia molto bassa probabilmente a causa del sistema di riproduzione ibrido (sia sessuale che vegetativo).

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

Considerato che, come indicato nella parte generale, un campione rappresentativo dovrebbe essere costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., 1995, ENSCONET, 2009), nel caso di *K. lycopifolia* questi valori possono essere facilmente raggiunti data l'elevata numerosità delle popolazioni presenti nel territorio umbro.

Inoltre la germinabilità dei semi sembra non essere un parametro da tenere in considerazione per determinare il numero di semi da raccogliere. Infatti, nonostante si possano avere percentuali basse di germinabilità con temperature di 5, 10 e 15°C e con un'alternanza di temperature 20/10°C, queste aumentano notevolmente se le temperature aumentano fino a 20-25°C ed i semi non sembrano aver bisogno di luce per germinare (Lermyte, 2004; Di Cecco e Frattaroli, 2018). Per aiutare la germinazione si può utilizzare inoltre la stratificazione nel freddo (Budisavljević et al, 2020).

Infine, dato che la specie produce rizomi che favoriscono lo sviluppo di colonie clonali, al fine di un'ottimale campagna di raccolta, potrebbero essere raccolti altri tipi di materiali di propagazione quali piante intere o rizomi. Questo tipo di collezione però, oltre a presentare difficoltà in più rispetto a quella dei semi (come spiegato nella parte generale), presenta caratteristiche distruttive e pertanto verrà riservata solo al reperimento di materiale in vivo da coltivare e conservare nell'Orto Botanico dell'Università degli Studi di Perugia. Quest'ultimo tipo di raccolta, nonostante la caratteristica distruttiva, non metterebbe a rischio le popolazioni umbre di *K. lycopifolia*, in quanto numerose e facilmente riproducibili per via clonale.

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

In *K. lycopifolia* i fiori compaiono tipicamente a metà giugno e la fioritura si completa entro la prima metà di luglio; i semi maturano entro la metà di agosto (Abdulhak, 2010).

Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo in cui avviene la maturazione dei frutti. L'ideale sarebbe prelevare lo stesso numero di semi (o di frutti) da ogni pianta campionata, allo stesso grado di maturazione, immediatamente prima della disseminazione. Nel caso di raccolta di piante, parti di piante o rizomi, la specie riprende la fase vegetativa alla fine di marzo.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Il protocollo per la raccolta dei semi e le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto non differiscono da quelli generali utilizzabili per molteplici specie.

***Ionopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang.**

Criteria per il campionamento

Ionopsidium savianum (Caruel) Ball ex Arcang. è presente in un'ampia gamma di habitat, da pascoli aridi, praterie montane e collinari, pendii rupestri, bordi di sentieri, orli e radure boschive, a contatto con formazioni arbustive a ginepro rosso o essenze della macchia mediterranea a quote comprese tra i 300 e i 1.600 m s.l.m. (Gigante et al., 2014b). Nuovi dati relativi a questi aspetti sono stati raccolti ed elaborati nell'ambito dell'Azione A11 e utilizzati per la produzione della Milestone "Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species" (Gigante et al., 2021e).

Scelta delle stazioni di raccolta

Il primo indicatore per la scelta delle stazioni di raccolta è la distribuzione, il numero e la consistenza di popolazioni della specie target.

In Umbria *I. savianum* è attualmente segnalata in 9 punti di presenza, 2 ricadenti in provincia di Perugia, 7 in territorio ternano (Gigante et al., 2021e).

Dato che la specie è stata segnalata in un ridotto numero di località, il campionamento ottimale sarà effettuato in tutti i siti di presenza, considerando le 9 stazioni, anche se dal punto di vista climatico non si differenziano in quanto rientrano nel Macroclima Temperato a Variante Bioclimatica Submediterranea, eccetto per il sito del complesso di M. La Pelosa (BER) che presenta un Macroclima strettamente Temperato (Gigante et al., 2021e).

Metodi di campionamento

Criteria di scelta delle popolazioni

Generalmente *I. savianum* si distribuisce nello spazio in modo diffuso, formando aggregati di dimensione, forma e densità molto variabili, occupando talora superfici di estensione notevole (Gigante et al., 2021e). All'interno di una stessa stazione, quindi, è difficile riconoscere e delimitare delle popolazioni e a maggior ragione le sottopopolazioni. Quindi nel caso specifico le popolazioni da campionare corrisponderanno ai nuclei di presenza corrispondenti alle stazioni di rilevamento.

Scelta del numero di individui da campionare

I. savianum si riproduce per via gamica mediante impollinazione entomofila e disseminazione barocora, anche se mancano studi su questo preciso argomento ed in Umbria è presente prevalentemente in popolazioni molto grandi in cui è preferibile campionare il più alto numero di individui possibile. Come indicato per le popolazioni molto numerose è preferibile campionare, per ciascuna di esse, circa 200 individui.

Scelta del numero di semi o altro materiale da prelevare

Considerato che, come indicato nella parte generale, un campione rappresentativo dovrebbe essere costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., 1995, ENSCONET, 2009), nel caso di *I. savianum* questi valori possono essere facilmente raggiunti. Infatti, nelle località indagate, la specie è abbondante e in buono stato, mostrando anche un elevato tasso di fioritura e fruttificazione e all'interno di ogni siliquetta sono contenuti 2-3 semi. Non sembra inoltre necessario il campionamento sovra numerario di semi, in quanto test di germinabilità evidenziano un buon successo germinativo in assenza di vernalizzazione (Caldarola, 2011) e con regime termico di 15-6 °C a seguito di un'estivazione di 5 mesi a 20°C, indifferentemente dalle condizioni di illuminazione (Roscini, 2016).

Raccolta in campo del germoplasma

Durante le operazioni di raccolta è importante tenere presente lo stadio di maturazione dei frutti e dei semi anche in funzione della loro dislocazione sulla pianta. La diversa posizione nell'infiorescenza può fornire, infatti, una maturazione scalare dei semi.

In *I. savianum* i fiori compaiono tipicamente precocemente in primavera, da Marzo ad Aprile, la specie presenta una fruttificazione tardo-primaverile con conclusione del ciclo biologico ad inizio Giugno (Gigante et al., 2021e). La germinazione avviene nel periodo autunnale. Per ridurre il rischio di perdita di semi maturi la raccolta dovrebbe svolgersi durante tutto il periodo in cui avviene la maturazione delle siliquette. L'ideale sarebbe prelevare lo stesso numero di semi (o di frutti) da ogni pianta campionata, allo stesso grado di maturazione, immediatamente prima della disseminazione.

Protocollo tecnico di raccolta in campo

Il protocollo per la raccolta dei semi e le informazioni essenziali sul campione di seme raccolto non differiscono da quelli generali utilizzabili per molteplici specie.

H-Key Species

Per le specie H-Key considerate nel progetto (selezionate ed elencate nel Deliverable dell'Azione A11 "*List of "H-key" plant species with a key role for reinforcement activities of target Annex I Habitats in Umbria*") è stata effettuata una ricerca bibliografica al fine di fornire informazioni specifiche per ciascuna di esse in relazione alle tecniche di collezionamento. A tale scopo sono stati visitati diversi siti web che forniscono informazioni sul collezionamento e la conservazione delle specie spontanee (e.g. [Royal Botanic Garden KEW](#)), la morfologia e fenologia (e.g. [acta plantarum](#)), il modo di riproduzione (e.g. [database of the Czech flora](#)) insieme alla consultazione di informazioni disponibili in articoli scientifici relativi a questi argomenti. Per la scelta delle stazioni, delle popolazioni e delle sotto-popolazioni e del numero di individui da campionare, si rimanda alla parte generale di questo documento.

La raccolta può coinvolgere una o più specie; è possibile utilizzare un'ampia gamma di tecniche di raccolta, a seconda della fenologia e della forma di crescita della specie bersaglio, delle dimensioni della popolazione, della

quantità di semi richiesta e del sito di raccolta (Pedrini et al., 2020). Dove possibile, sono state anche reperite informazioni specifiche per le diverse H-Key species considerate riguardanti la percentuale di germinabilità dei semi e il grado potenziale di semi vuoti e danneggiati in modo da dare una stima precisa sul numero di semi necessari da collezionare. Considerato che, come indicato nella parte generale, un campione rappresentativo dovrebbe essere costituito da un numero di semi variabile da 2500 a 5000 (Guarino et al., 1995; ENSCONET, 2009), per alcune specie quali: *Armeria arenaria* (Pers.) Schult., *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. Presl et C. Presl., *Bromus hordeaceus* L., *Catapodium rigidum* (L.) C.E.Hubb., *Dactylis glomerata* L., *Danthonia decumbens* (L.) DC., *Daucus carota* L., *Dianthus deltoides* L. subsp. *deltoides*, *Festuca inops* De Not., *Festuca rubra* L., *Hypochaeris achyrophorus* L., *Juncus bufonius* L., *Juncus bulbosus* L., *Juncus capitatus* Weigel, *Juncus pygmaeus* Rich. ex Thuill., *Lolium perenne* L., *Lotus corniculatus* L., *Mentha pulegium* L. subsp. *pulegium*, *Petrorhagia saxifraga* (L.) Link, *Pilosella officinarum* Vaill., *Plantago lanceolata* L., *Poa trivialis* L., *Potentilla erecta* (L.) Raeusch., *Ranunculus ophioglossifolius* Vill., *Sedum album* L., *Sedum sexangulare* L., *Trifolium pratense* L., *Trifolium scabrum* L., dove la percentuale di germinabilità supera l'80% (SID, 2022) non è necessario aumentare il numero di semi da raccogliere, mentre per *Cicendia filiformis* (L.) Delarbre, dove la germinabilità è circa del 60%, sarebbe opportuno aumentare il numero di semi collezionati di circa il 40%. Inoltre, per le specie appartenenti alle famiglie delle *Rosaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Cyperaceae*, *Apiaceae*, *Plumbaginaceae* ed *Asteraceae* dove la percentuale di semi vuoti supera il 50% (ENSCONET, 2009) sarebbe opportuno aumentare il numero di semi collezionati di circa il 50-60%, arrivando a collezionare almeno 10.000 semi in più anni di raccolta. Per le specie appartenenti alle famiglie delle *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Plantaginaceae*, *Euphorbiaceae* e *Caryophyllaceae*, in cui la percentuale di semi vuoti varia dal 20 al 40% (ENSCONET, 2009), sarà opportuno aumentare la quantità di seme da collezionare di circa il 30%, mentre per le restanti specie dove la percentuale di semi vuoti è inferiore al 20% (ENSCONET, 2009) non è necessario aumentare il numero di semi da prelevare. Infatti, quando i semi danneggiati sono normalmente in percentuali relativamente basse (inferiori al 20%) (ENSCONET, 2009) non appare necessario variare sostanzialmente la dimensione del campione di semi da collezionare.

Una tra le informazioni di maggiore rilevanza per la scelta della metodologia di raccolta del materiale di propagazione, di conservazione e riproduzione del seme delle accessioni collezionate è quella relativa alla biologia riproduttiva della specie. Anche se la maggior parte delle specie spontanee si riproducono per allogamia, sistema piuttosto diffuso tra le piante spontanee, informazioni dettagliate sono state reperite per ciascuna di esse e riportate in Tabella 1 assieme alle fonti bibliografiche consultate.

Tabella 1. Nome latino della specie, famiglia di appartenenza, modo di riproduzione e sistema di impollinazione prevalenti, tipologia di organi di riproduzione vegetativa (quando presenti) e fonte bibliografica.

Species	Family	Prevalent reproductive system	Pollination system	Vegetative propagation	Bibliographic references
<i>Armeria arenaria</i> (Pers.) Schult.	Plumbaginaceae	Other Armeria: allogamy self-incompatibility	Insect-pollination, selfing		https://pladias.cz/en/taxon/data/Armeria%20elongata
<i>Armeria gracilis</i> Ten.	Plumbaginaceae	Other Armeria: allogamy self-incompatibility	Insect-pollination, selfing		https://pladias.cz/en/taxon/data/Armeria%20elongata
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. Beauv. ex J. Presl et C. Presl	Poaceae	Facultative allogamy	Wind-pollination, selfing	Hypogeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Arrhenatherum%20elatius
<i>Bellardiocloa variegata</i> (Lam.) Kerguelen	Poaceae	Unknown			
<i>Brachypodium genuense</i> (DC.) Roem. et Schult.	Poaceae	Other Brachypodium: autogamy			Plant Diversity in Sardinian Mountain Rangelands: Analysis of Its Relationships with Grazing, Land Management, and Pastoral Value
<i>Bromopsis erecta</i> (Huds.) Fourr.	Poaceae	Facultative allogamy	wind-pollination	Epigeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Bromus%20erectus
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	Poaceae	Autogamy, facultative autogamy	wind-pollination, selfing, cleistogamy	Absent	https://pladias.cz/en/taxon/data/Bromus%20hordeaceus
<i>Callitriche brutia</i> Petagna	Plantaginaceae	Autogamy	Wind-pollination, water-pollination, geitonogamy	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/overview/Callitriche%20hamulata
<i>Campanula micrantha</i> Bertol.	Campanulaceae	Allogamy self-incompatibility, facultative allogamy		Epigeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Campanula%20rotundifolia
<i>Carex macrolepis</i> DC.	Cyperaceae	Other Carex: allogamy self-incompatibility	Wind-pollination	Stolon, rhizome	
<i>Catapodium rigidum</i> (L.) C.E.Hubb.	Poaceae	Autogamy		Little or no vegetative spread	Plant Diversity in Sardinian Mountain Rangelands: Analysis of Its Relationships with Grazing, Land Management, and Pastoral Value
<i>Centaurea nigrescens</i> Willd. subsp. <i>neapolitana</i> (Boiss.) Dostáli	Asteraceae	Allogamy, self-incompatibility	Insect-pollination	Hypogeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Centaurea%20nigrescens
<i>Cicendia filiformis</i> (L.) Delarbre	Gentianaceae	Unknown	Little or no vegetative spread		https://plantatlas.brc.ac.uk/plant/cicendia-filiformis
<i>Dactylis glomerata</i> L.	Poaceae	Allogamy self-incompatibility, facultative allogamy	wind-pollination, selfing	Epigeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Dactylis%20glomerata
<i>Dactylorhiza sambucina</i> (L.) Soó	Orchidaceae	Facultative autogamy	Insect-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Dactylorhiza%20sambucina
<i>Danthonia decumbens</i> (L.) DC.	Poaceae	Facultative autogamy	wind-pollination, cleistogamy	Epigeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Danthonia%20decumbens
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	Facultative allogamy	Insect-pollination, selfing		https://pladias.cz/en/taxon/data/Daucus%20carota
<i>Dianthus deltoides</i> L. subsp. <i>deltoides</i>	Caryophyllaceae	Facultative allogamy	Insect-pollination	Hypogeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Dianthus%20deltoides
<i>Euphorbia exigua</i> L. subsp. <i>exigua</i>	Euphorbiaceae	Mixed mating	Insect-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Euphorbia%20exigua
<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	Poaceae	Allogamy	wind-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Festuca%20ovina
<i>Festuca inops</i> De Not.	Poaceae	Allogamy	wind-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Festuca%20ovina
<i>Festuca rubra</i> L.	Poaceae	Allogamy self-incompatibility, facultative allogamy	wind-pollination	Epigeous rhizome, hypogeous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Festuca%20rubra
<i>Galium debile</i> Desv.	Rubiaceae	Mixed mating	insect-pollination, selfing	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/data/Galium%20palustre
<i>Hypochaeris achyrophorus</i> L.	Asteraceae	Other Hypochaeris: facultative allogamy	Insect-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Hypochaeris%20maculata
<i>Isoetes histrix</i> Bory	Isoëtaceae	Reproduces by spores	Little or no vegetative spread	Production of spores	https://plantatlas.brc.ac.uk/plant/isoetes-histrix

segue a pagina successiva

Species	Family	Prevalent reproductive system	Pollination system	Vegetative propagation	Bibliographic references
<i>Juncus bufonius</i> L.	Juncaceae	Autogamy	Wind-pollination, cleistogamy	Absent	https://pladias.cz/en/taxon/data/Juncus%20bufonius
<i>Juncus bulbosus</i> L.	Juncaceae	Mixed mating	Wind-pollination	Epigeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Juncus%20bulbosus
<i>Juncus capitatus</i> Weigel	Juncaceae	Facultative autogamy	Wind-pollination, cleistogamy		https://pladias.cz/en/taxon/data/Juncus%20capitatus
<i>Juncus pygmaeus</i> Rich. ex Thuill.	Juncaceae	Unknown			
<i>Juncus tenageia</i> L.f. subsp. <i>tenageia</i>	Juncaceae	Mixed mating	Wind-pollination, pseudocleistogamy		https://pladias.cz/en/taxon/data/Juncus%20tenageia
<i>Lolium perenne</i> L.	Poaceae	Allogamy self-incompatibility, facultative allogamy	wind-pollination	Absent	https://pladias.cz/en/taxon/data/Lolium%20perenne
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Fabaceae	Allogamy self-incompatibility	Insect-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Lotus%20corniculatus
<i>Luzula multiflora</i> (Ehrh.) Lej. subsp. <i>Multiflora</i>	Juncaceae	Mixed mating	Wind-pollination, insect-pollination	Epigeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Luzula%20multiflora
<i>Mentha pulegium</i> L. subsp. <i>Pulegium</i>	Lamiaceae	Facultative autogamy	Insect-pollination	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/data/Mentha%20pulegium
<i>Nardus stricta</i> L.	Poaceae	Allogamy, apomixis	wind-pollination	Hypogeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Nardus%20stricta
<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	Caryophyllaceae	Mixed mating	Insect-pollination, selfing		https://pladias.cz/en/taxon/data/Petrorhagia%20saxifraga
<i>Pilosella officinarum</i> Vaill.	Asteraceae	Allogamy self-incompatibility, facultative apomixis	Insect-pollination, selfing	Stolon, rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/overview/Pilosella%20officinarum
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	Allogamy self-incompatibility, facultative allogamy	Wind-pollination, water-pollination, geitonogamy		https://pladias.cz/en/taxon/data/Plantago%20lanceolata
<i>Poa trivialis</i> L.	Poaceae	Mixed mating	wind-pollination	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/data/Poa%20trivialis
<i>Potentilla erecta</i> (L.) Roesch.	Rosaceae	Allogamy self-incompatibility	insect-pollination	Epigeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Potentilla%20erecta
<i>Ranunculus ophioGLOSSIFOLIUS</i> Vill.	Ranunculaceae	Unknown		Little or no vegetative spread	https://plantatlas.brc.ac.uk/plant/ranunculus-ophioGLOSSIFOLIUS
<i>Ranunculus velutinus</i> Ten.	Ranunculaceae	Facultative allogamy	insect-pollination, selfing	Epigeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Ranunculus%20lanuginosus
<i>Salvia pratensis</i> L.	Lamiaceae	Facultative autogamy	Insect-pollination, selfing		https://doi.org/10.1111/1365-2745.13805 https://pladias.cz/en/taxon/data/Salvia%20pratensis
<i>Sedum album</i> L.	Crassulaceae	Facultative allogamy	Insect-pollination, selfing	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/data/Sedum%20album
<i>Sedum sexangulare</i> L.	Crassulaceae	Facultative allogamy	Insect-pollination, selfing	Stolon	https://pladias.cz/en/taxon/data/Sedum%20sexangulare
<i>Senecio scopoli</i> Hoppe & Hornsch.	Asteraceae	Other Senecio: allogamy self-incompatibility	Insect-pollination	Hypogeogenous rhizome	https://pladias.cz/en/taxon/data/Senecio%20ovatus
<i>Solenopsis laurentia</i> (L.) C. Presl	Campanulaceae	Facultative allogamy			https://www.flowersofchania.com/solenopsis-minuta-ssp-annua.html
<i>Taraxacum</i> F.H.Wigg. sect. <i>Taraxacum</i>	Asteraceae	Allogamy, facultative apomixis			https://doi.org/10.1002/feDr.4921120105
<i>Tragopogon pratensis</i> L.	Asteraceae	Mixed mating			https://pladias.cz/en/taxon/data/Tragopogon%20pratensis
<i>Trifolium pratense</i> L.	Fabaceae	Allogamy self-incompatibility	Insect-pollination		https://pladias.cz/en/taxon/data/Trifolium%20pratense
<i>Trifolium scabrum</i> L.	Fabaceae	Facultative allogamy	Insect-pollination		Plant Diversity in Sardinian Mountain Rangelands: Analysis of Its Relationships with Grazing, Land Management, and Pastoral Value

La conoscenza dell'epoca di fioritura e del raggiungimento della maturità dei semi nelle diverse popolazioni delle specie da collezionare è un altro dato di fondamentale importanza per eseguire collezioni fruttuose. Per tutte le species H-Key i dati relativi al periodo di fioritura sono stati reperiti dal sito [acta plantarum](https://acta.plantarum) e sono disponibili in Tabella 2 assieme a raccomandazioni sul migliore approccio per la raccolta di materiale di propagazione da utilizzare in eventuali azioni di rinforzo degli habitat. Le raccomandazioni fornite sono state elaborate sulla base delle caratteristiche morfo-fenologiche peculiari di ciascuna specie considerata.

Tabella 2. Nome latino della specie, epoca di fioritura e raccomandazioni sul migliore approccio di raccolta di materiale per la propagazione della specie in azioni di rinforzo degli habitat

Species	Epoca di fioritura	Migliore approccio di raccolta di materiale "propagazione" per rinforzo degli habitats
<i>Armeria arenaria</i> (Pers.) Schult.	Maggio - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Armeria gracilis</i> Ten.	Magigo - Agosto	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. Beauv. ex J. Presl et C. Presl	Aprile - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Bellardiochloa variegata</i> (Lam.) Kerguélen	Luglio - Agosto	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Brachypodium genuense</i> (DC.) Roem. et Schult.	Aprile - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Bromopsis erecta</i> (Huds.) Fourr.	Aprile - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	Aprile - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Callitriche brutia</i> Petagna	Aprile - Ottobre	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Campanula micrantha</i> Bertol.	Giugno - Agosto	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Carex macrolepis</i> DC.	Aprile - Luglio	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Catapodium rigidum</i> (L.) C.E.Hubb.	Marzo - Luglio	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Centaurea nigrescens</i> Willd. subsp. <i>neapolitana</i> (Boiss.) Dostáli	Giugno - Agosto	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Cicendia filiformis</i> (L.) Delarbre	Marzo - Maggio	Suggestita la raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Dactylis glomerata</i> L.	Febbraio - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Dactylorhiza sambucina</i> (L.) Soó	Marzo - Giugno	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Danthonia decumbens</i> (L.) DC.	Aprile - Giugno	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Daucus carota</i> L.	Aprile - Ottobre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Dianthus deltoides</i> L. subsp. <i>deltoides</i>	Aprile - Agosto	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Euphorbia exigua</i> L. subsp. <i>exigua</i>	Marzo - Agosto	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	Marzo - Luglio	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Festuca inops</i> De Not.	Marzo - Giugno	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Festuca rubra</i> L.	Aprile - Ottobre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Galium debile</i> Desv.	Aprile - Luglio	Suggestita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Hypochaeris achyrophorus</i> L.	Gennaio - Luglio	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Isoëtes histrix</i> Bory	Novembre - Aprile	Traslocazione diretta di tutto l'individuo

segue a pagina successiva

Species	Epoca di fioritura	Migliore approccio di raccolta di materiale "propagazione" per rinforzo degli habitats
<i>Juncus bufonius</i> L.	Marzo - Settembre	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Juncus bulbosus</i> L.	Maggio - Luglio	Suggerita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Juncus capitatus</i> Weigel	Marzo - Maggio	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Juncus pygmaeus</i> Rich. ex Thuill.	Marzo - Maggio	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Juncus tenageia</i> L.f. subsp. tenageia	Aprile - Luglio	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Lolium perenne</i> L.	Febbraio - Ottobre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Marzo - Settembre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Luzula multiflora</i> (Ehrh.) Lej. subsp. <i>Multiflora</i>	Marzo - Giugno	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Mentha pulegium</i> L. subsp. <i>Pulegium</i>	Aprile - Settembre	Prelievo vegetativo
<i>Nardus stricta</i> L.	Maggio - Agosto	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	Giugno - Settembre	Consigliabile reperimento materiale ad hoc, difficile attuare conservazione ex situ
<i>Pilosella officinarum</i> Vaill.	Aprile - Ottobre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Febbraio - Ottobre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Poa trivialis</i> L.	Aprile - Settembre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raesch.	Aprile - Agosto	Suggerita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Ranunculus ophioglossifolius</i> Vill.	Febbraio - Luglio	Suggerita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Ranunculus velutinus</i> Ten.	Marzo - Giugno	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Salvia pratensis</i> L.	Aprile - Agosto	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Sedum album</i> L.	Maggio - Agosto	Prelievo vegetativo
<i>Sedum sexangulare</i> L.	Aprile - Luglio	Prelievo vegetativo
<i>Senecio scopolii</i> Hoppe & Hornsch.	Aprile - Giugno	Suggerita la raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Solenopsis laurentia</i> (L.) C. Presl	Aprile - Agosto	Suggerita raccolta seme per conservazione ex situ
<i>Taraxacum</i> F.H.Wigg. sect. <i>Taraxacum</i>	Gennaio - Dicembre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Tragopogon pratensis</i> L.	Aprile - Agosto	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Trifolium pratense</i> L.	Gennaio - Dicembre	Utilizo diretto del fiorume in campo
<i>Trifolium scabrum</i> L.	Marzo - Giugno	Suggerita la raccolta seme per conservazione ex situ

È comunque utile ricordare in questa sede l'epoca di fioritura (i.e. il momento in cui la fioritura avviene) è comunemente soggetta a variazioni, anche di un certo rilievo, in relazione all'andamento climatico delle diverse annate. Per questo motivo è importante, ove possibile, confermare i dati reperiti in bibliografia con sopralluoghi nei siti di presenza. In particolare, sarebbe opportuno effettuare una ricognizione nella/e stazione/i di occorrenza delle diverse specie a partire dalla seconda metà del periodo di fioritura per verificare il procedere della stessa e stimare il periodo più opportuno per effettuare poi la raccolta dei frutti o semi maturi. Tale precauzione può

certamente aumentare le possibilità di ottenere materiale di propagazione in quantitativi adeguati anche in annate particolarmente sfavorevoli, come ad esempio quelle siccitose in cui la fioritura e la conseguente maturazione dei frutti possono essere fortemente anticipati.

BIBLIOGRAFIA

- Abdulhak S (Ed.) (2010). Bilan régional des connaissances sur la Serratule à feuille de chanvre d'eau (*Serratula lycopifolia* (Vill.) A. Kerner). Rapport scientifique. Conservatoire Botanique National Alpin, Dreal Paca. 32 pp.
- Bacchetta G, Belletti P, Brullo S, Cagelli L, Carasso V, Casas J, Cervelli C, Escribà M, Fenu G, Gorian F, Güemes J, Mattana E, Nepi M, Pacini E, Pavone P, Piotto B, Pontecorvo C, Prada A, Venora G, Vietto L and Virevaire M (2006). Manuale per la raccolta, studio, Conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma APAT, Italy
- Bacchetta G, Fenu G, Mattana E, Piotto B (2014). Procedure per il campionamento *in situ* e la conservazione *ex situ* del germoplasma. Manuali e linee guida ISPRA 118/2014
- Baksay L (1957). The cytotaxonomy of the species *Chrysanthemum maximum* Ram., *Centaurea montana* L., *Serratula lycopifolia* (Vill.) Kern., and *Bupleurum falcatum* L., ranging in Europe. Ann. Hist. Nat. Mus. Nat. Hung., 8(s. nova): 155-168.
- Ballelli S, Caldarola L, Gigante D, Landucci F, Maneli F, Venanzoni R (2010). Le specie vegetali dell'All. II alla Dir. 92/43/CEE in Umbria: aggiornamento dei dati distributivi e cartografia floristica. 105° Congr. S.B.I., Milano, 25/28 agosto 2010. Riassunti: 146. Ballelli S, Gigante D, Venanzoni R (2012). Notulae alla Check-list della Flora vascolare Italiana, 13: 1903. Inform. Bot. Ital., 44(1): 180.
- Bartolucci F, Peruzzi L, Galasso G, Albano A, Alessandrini A, Ardenghi N, Astuti G, Bacchetta G, Ballelli S, Banfi E, Barberis G, Bernardo L, Bouvet D, Bovio M, Cecchi L, Di Pietro R, Domina G, Fascetti S, Fenu G, Conti F (2018). An updated checklist of the vascular flora native to Italy. Plant Biosystems. 152. 179-303. 10.1080/11263504.2017.1419996.
- Bódis J, Biró É, Nagy T, Takács A, Molnár AV, Lukács AB (2018). Habitat preferences of the rare lizard-orchid *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann. Tuexenia 38: 329–345. DOI: 10.14471/2018.38.020
- Bódis J, Biró É, Nagy T, Takács A, Sramkó G, Bateman RM, Gilián L, Illyés Z, Tökölyi J, Lukács BA, Csábi M, Molnár AV (2019). Biological flora of Central Europe *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 40: 125461. DOI: 10.1016/j.ppees.2019.125461
- Brown AHD and Marshall DR (1995). A basic sampling strategy: theory & practice. In Collecting Plant Genetic Diversity, Eds. Guarino L, Ramanatha Rao V and Reid R CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Budisavljević A, Sandev D, Randić M, Stamenković V, Kovačić S (2020). Seed dormancy and germination of five selected NATURA-2000 plant species from Croatia showing different germination strategies, Plant Biosystems, 155(1): 116-127. DOI: 10.1080/11263504.2020.1727978
- Cagiotti MR, Loreti M, Salerno P, Ranfa A, Romano B (1992). Sulla presenza di *Iris chamaeris* Bertol. In Umbria. Estratto da: Annali Facoltà di Agraria Vol. XLIV, 1990. Perugia.
- Cain ML, Milligan BG and Strand AE (2000). Long-distance seed dispersal in plant populations. American Journal of Botany, 87(9):1217-1227.
- Caldarola L (2011). *Ionopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang.: analisi delle caratteristiche morfologiche, ecologiche e di germinabilità delle popolazioni umbre (Italia centrale). Tesi di Laurea in Botanica Ambientale.

- Corso di Laurea in Scienze della Natura e dell’Ambiente, Facoltà di Scienze MM. FF. NN., Università degli Studi di Perugia. Anno Accademico 2010/2011.
- Cantó P (2010). Biogeographic and bioclimatic distribution of *Klasea* Cass. and *Serratula* L.. *Acta Bot. Gallica*, 158 (2), 239-249, 2011.
- Carey PD and Farrell L (2002). *Himantoglossum hircinum* (L.) Sprengel. *Journal of Ecology* 90.1 (2002): 206-218.
- Caruso F (2016). Monitoraggio e analisi molecolare della popolazione umbro-marchigiana di *Klasea lycopifolia* (Vill.) Á. Löve et D. Löve. Tesi di Laurea in Sistemi Vegetali. Univ. Perugia, A.A. 2016-2017.
- Cieslak E (2013). Variation and genetic structure of *Serratula lycopifolia* populations (Vill.) Kern.(Asteraceae) in Poland and adjacent regions. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 82(1).
- Chorlton KH, Sackville Hamilton NR, Thomas ID and Jones MH (2003). Vegetative collection of forage grasses and legumes, and method of regeneration for seed. In: *Seed conservation: turning science into practice*, Eds. Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW and Probert RJ. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Claessens J and Kleynen J (2016). The Pollination of European Orchids Part 5: *Himantoglossum* and *Anacamptis*, Two Examples of Deceptive Pollination. *Journal of the Hardy Orchid Society* 13(4): 114–123.
- Colasante M (2014). Iridaceae presenti in Italia – Iridaceae Present in Italy. Università La Sapienza (Roma). 415 pp.
- Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchids mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-007-0138-1>
- Di Cecco V, LIFE FLORANET (2016-2020) Deliverable Action C.1 “Data on reproductive part on *Klasea lycopifolia* in the Sirente Velino Regional Park”. <https://www.floranetlife.it/it/pubblicazioni-scientifiche/>
- Di Cecco V and Frattaroli AR (2018). Relazione per la seconda annualità del contratto di ricerca finanziato per lo svolgimento delle attività dell’azione C4 (Riproduzione da seme) nell’ambito del PROGETTO LIFE 15 NAT/IT7000946 FLORANET “Safeguard and valorization of the plant species of EU interest in the Natural Parks of the Abruzzo Apennine” in favore del Beneficiario Coordinatore del Progetto. <https://www.floranetlife.it/it/pubblicazioni-scientifiche/>
- Di Musciano M, Di Cecco V, Bartolucci F, Conti F, Frattaroli AR, Di Martino L (2020). Dispersal ability of threatened species affects future distributions. *Plant Ecology*, 221, 265-281. <https://www.floranetlife.it/it/pubblicazioni-scientifiche/>
- ENSCONET (2009). ENSCONET Seed Collecting Manual for Wild Species
- Falk DA and Holsinger KE (Eds.) (1991). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. 225-237. Oxford University Press, New York, USA.
- Ferri V (2010). Studio della popolazione umbro-marchigiana di *Klasea lycopifolia* (Vill.) Á. Löve et D. Löve, specie dell’All. II alla Dir. 92/43/CEE. Tesi Laurea Triennale in Botanica Ambientale, Univ. Perugia, A.A. 2010-11.
- Frattaroli AR, Di Martino L, Di Cecco V, Cantoni R, Varone L, Di Santo M, Gratani L (2013). Seed germination capability off our endemic species in the Central Apennines (Italy): relationships with seed size. *Lazaroa* 34: 43-53.
- García MA (2002). Interés de los estudios demográficos en la conservación. Catalogación de especies amenazadas. In: *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid.

- Gigante D, Alessandrini A, Ballelli S, Bartolucci F, Conti F, Ferri V, Gubellini L, Hofmann N, Montagnani C, Pinzi M, Venanzoni R, Wagensommer RP (2014a). Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana: *Klasea lycopifolia* (Vill.) Á.Löve et D.Löve. Inform. Bot. Ital. 46(1): 128-131. ISSN: 0020-0697
- Gigante D, Attorre F, Caldarola L, De Sanctis M, Foggi B, Gennai M, Montagnani C, Serafini Sauli A, Viciani D (2014b). *Jonopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang. In: Schede per una Lista Rossa della Flora vascolare e crittogamica Italiana. Informatore Botanico Italiano 46 (1): 93-152.
- Gigante D and Maneli F (2017). Report "Linee Guida per il Monitoraggio di Specie Vegetali ed Habitat". 30 giugno 2017. LIFE13 NAT/IT/000371 SUN LIFE Strategy for the Natura 2000 Network of the Umbria Region ACTION D.1: Formulazione e avvio dell'implementazione del programma di monitoraggio scientifico della rete.
- Gigante D, Ferri V, Bonini F (2021a). A11 - Milestone: Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species. *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann. LIFE IMAGINE – IPE/IT/000015
- Gigante D, Ferri V, Bonini F (2021b). A11 - Milestone: Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species. *Iris marsica* I.Ricci & Colas.. LIFE IMAGINE – IPE/IT/000015
- Gigante D, Ferri V, Bonini F (2021c). A11 - Milestone: Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species. *Adonis distorta* Ten.. LIFE IMAGINE – IPE/IT/000015
- Gigante D, Ferri V, Bonini F (2021d). A11 - Milestone: Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species. *Klasea lycopifolia* (Vill.) Á.Löve et D.Löve. LIFE IMAGINE – IPE/IT/000015
- Gigante D, Ferri V, Bonini F (2021e). A11 - Milestone: Maps and census of the target populations of the 5 Annex II-IV target plant species. *Jonopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang.. LIFE IMAGINE – IPE/IT/000015
- Groves C (2003). Drafting a conservation blueprint: A practitioner's guide to planning for biodiversity. Island Press, Washington DC, USA.
- Guarino L, Ramantha Rao V and Reid R (1995). Collecting plant genetic diversity. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Guerrant EO Jr, Fiedler PL, Havens K and Maunder M (2004). Appendix 1 Revised genetic sampling guidelines for conservation collections of rare and endangered plants In: *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild, Eds Guerrant EO Jr, Havens K and Maunder M Island Press, Washington DC, USA
- Lermyte C (2004). Programmes expérimentaux de germination sur deux espèces végétales menacées de disparition, *Primula halleri* J.F Gmelin et *Serratula lycopifolia* (Vill.) A Kerner. Rapport MASTER 1, Univ. Paris. 41 pp.
- Loreti M (1986). La flora dell'Appennino Gualdese. Amministr. Prov. Perugia, Nuova Zincografia Fiorentina: 9–91.
- Marshall DR and Brow AHD (1975). Optimum sampling strategies in genetic conservation. In Crop genetic resources for today and tomorrow. Eds. Frankel, O.H and Hawkes JG Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Marshall DR and Brow AHD (1983). Theory of forage plant collection. In Genetic Resources of Forage Plants. Eds. McIvor JG and Bray RA CSIRO, Melbourne, Australia.
- MSBP Technical Information Sheets n.2,3. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/info_sheets.htm (visualizzato 16 giugno 2022)
- Neel MC and Cummings MP (2003). Effectiveness of conservation targets in capturing genetic diversity. Conservation Genetics, 17(1):219–229.

- Pecoraro L, Girlanda M, Kull T, Perini C, Perotto S (2013). Fungi from the roots of the terrestrial photosynthetic orchid *Himantoglossum adriaticum*. *Plant Ecology and Evolution* 146(2): 145–152. DOI: 10.5091/plecevo.2013.782
- Pedrini S, Gibson-Roy P, Trivedi C, Gálvez-Ramírez C, Hardwick K, Shaw N, Frischie S, Laverack G and Dixon K (2020) Collection and production of native seeds for ecological restoration. *Restoration Ecology*, 28: S228-S238. <https://doi.org/10.1111/rec.13190>
- Pignatti S (1982). *Flora d'Italia*. Vol. 1. P. 300-301 Edagricole, Bologna.
- Rasmussen HN (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149–163. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020246715436>
- Roscini G (2016). Studio delle Popolazioni Umbre e Laziali di *Jonopsidium savianum* Caruel (Arcang) specie dell'Allegato II delle Direttiva Habitat. Tesi di Laurea in Botanica Ambientale. Corso di Laurea Magistrale in Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze MM. FF. NN., Università degli Studi di Perugia. Anno Accademico 2015/2016.
- Royal Botanic Gardens Kew. (2022) Seed Information Database (SID). Version 7.1. Available from: <http://data.kew.org/sid/> (visualizzato 16 giugno 2022)
- Salerno P, Puletti E (1994). Nuove ricerche floristico-vegetazionali nel Massiccio del Monte Cucco. In: *Il Grifo Bianco*, Sigillo, pp. 83-103.
- Slaviero A, Del Vecchio S, Pierce S, Fantinato E, Buffa G (2016). Plant community attributes affect dry grassland orchid establishment. *Plant Ecology* 217, 1533–1543. <https://doi.org/10.1007/s11258-016-0666-x>
- Sonkoly J, Vojtkó EA, Tökölyi J, Török P, Sramkó G, Illyés Z, Molnár VA (2016). Higher seed number compensates for lower fruit-set in deceptive orchids. *Journal of Ecology* 104, 343–351. DOI: 10.1111/1365-2745.12511
- Stinca A, Bartolucci F, Conti F (2016). *Adonis distorta* Ten. In: Ercole S, Giacanelli V, Bacchetta G, Fenu G, Genovesi P (Eds.) *Manuali per il monitoraggio di specie e habitat di interesse comunitario (Direttiva 92/43/CEE) in Italia: specie vegetali*. ISPRA, Serie Manuali e linee guida, 140/2016, pp. 62–63.
- Way MJ (2003). Collecting seed from non-domesticated plants for long-term conservation. In: *Seed conservation: turning science into practice*, Eds. Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW and Probert RJ Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Siti consultati

<http://dryades.units.it/floritaly>

<http://vnr.unipg.it/sunlife/>

<https://www.kew.org>

<http://dryades.units.it>

SEZIONE 2 - CONSERVAZIONE *EX SITU* E GESTIONE DELLE BANCHE DI GERMOPLASMA

Introduzione

Con la conservazione *ex situ* si mantengono popolazioni o genotipi al di fuori dall'ambiente nel quale si sono evoluti, sottraendoli cioè a tutto quel complesso di interazioni fra elementi viventi e non viventi che determina pressioni evolutive. La conservazione *ex situ* è tesa a mantenere le caratteristiche genetiche di popolazioni (o genotipi), per questo si tratta di una conservazione 'statica'. Pertanto è opportuno notare come essa sia sempre utilmente completata dalla conservazione *in situ*, cioè nell'ambiente di adattamento, che è una conservazione 'dinamica'.

Scopo della conservazione *ex situ*, oltre al conservare materiale necessario a sviluppare nuove varietà tramite miglioramento genetico, è quello di rendere possibile la salvaguardia di patrimoni genetici a rischio di estinzione. Infatti mantenerli *ex situ* garantisce la possibilità di una loro futura reintroduzione nell'ambiente di originario adattamento (restauro ambientale).

Un modo per fare conservazione *ex situ* è costituire Banche di germoplasma. Una Banca di germoplasma è un sistema funzionale, organico e ragionato di 'stoccaggio' di materiali di propagazione (semi, talee, apici/plantule in vitro, polline), o di piante intere, e di organizzazione delle informazioni ad essi relative.

La conservazione *ex situ*: principi generali

Per conservazione *ex situ* si intende una azione di salvaguardia delle risorse genetiche svolta al di fuori del loro areale di adattamento.

Le strategie di conservazione *ex situ* si applicano di norma ai pool genici di specie che hanno un'importanza economica attuale, anche se molte specie oggi non direttamente utili all'uomo hanno bisogno di specifici interventi come appunto quelle di Annex II-IV e le H_key species.

In generale, è necessario avere a disposizione materiale *ex situ*:

a) quando, per il miglioramento genetico, per lo sfruttamento diretto, la rinaturazione o il rafforzamento delle popolazioni *in situ*, sia necessario avere materiale di propagazione rapidamente, continuamente e a basso costo.

b) quando non sia possibile salvaguardare *in situ* popolazioni o genotipi a causa di un dilagante inquinamento, della costruzione di strade, edifici, altri manufatti, o di eventi catastrofici che ne minino la futura sopravvivenza;

c) quando in popolazioni autoctone di valore ci sia pericolo di inquinamento delle frequenze geniche da parte di popolazioni vicine alloctone.

La conservazione *ex situ* è applicabile con certezza di successo soltanto a quelle specie di cui sia ben nota la biologia, il sistema riproduttivo e le tecniche colturali e/o di conservazione di talee, semi, polline o tessuti.

Sono le cosiddette "banche di germoplasma" a conservare la diversità genetica. L'opera di conservazione si realizza conservando piante intere in campo o materiali come plantule, talee, semi o polline, in ambiente controllato. In prospettiva si pensa che sia possibile anche conservare il solo DNA delle specie e o delle popolazioni che interessano.

I principi che devono essere considerati nel decidere come fare e come mantenere una collezione sono i seguenti:

- 1) contenuti e scopo della collezione,

- 2) località dove collezionare variabilità genetica (vedi sezione precedente),
- 3) località dove mantenere la collezione,
- 4) metodologie da utilizzare nella raccolta e nel mantenimento delle collezioni,
- 5) scelta del sistema di informazioni e
- 6) utilizzazione (specie nel caso di piante coltivate).

Una collezione *ex situ* è costituita da un insieme di diversi materiali che prendono il nome di "accessioni" di cui è necessario avere un adeguato livello di informazione.

Il livello di informazione che si ha su di una accessione e la possibilità di scambio di tali informazioni ha una enorme importanza perchè condiziona l'uso della variabilità genetica raccolta.

I dati relativi a ciascuna accessione in collezione prendono il nome di descriptors (descrittori); essi identificano l'accessione attraverso la sigla della banca di germoplasma, il numero d'ordine dell'accessione, genere e specie, località di raccolta (con precise coordinate geografiche), anno di raccolta, e la descrivono utilizzando caratteri genetici, morfologici ed, eventualmente, agronomici.

Le informazioni relative alle singole accessioni vengono generalmente raccolte in archivi computerizzati.

Le banche del germoplasma che hanno la responsabilità di mantenere i pool genici di determinate specie (ad es. quella di Aberystwyth in Gran Bretagna per il *Lolium perenne* e il *Trifolium repens*) redigono e pubblicano cataloghi delle accessioni presenti in collezione con almeno alcuni dati di base. La tendenza è di accrescere la quantità di informazioni che caratterizzano un'accessione.

Lo scopo prevalente della conservazione *ex situ* è prevalentemente quello di impedire una perdita di diversità genetica (cioè una perdita di alleli) e viene perciò definita una conservazione 'statica'.

La conservazione *ex situ* di piante intere

Problemi e conduzione

Alcune specie spontanee non producono semi, o producono semi "recalcitranti" (quelli cioè che perdono germinabilità con l'essicazione e il congelamento) o semi che germinano con difficoltà; esse vengono normalmente propagate vegetativamente. La diversità di tali specie, quando non sia possibile (perchè le tecniche non sono ancora messe a punto) oppure conveniente conservarle come plantule, talee o meristemi allevati *in vitro*, viene normalmente mantenuta in impianti (collezioni viventi).

Una corretta conduzione degli impianti *ex situ* destinati a mantenere o propagare clonalmente varietà o popolazioni o genotipi deve avere a disposizione le conoscenze scientifiche, le metodologie e le apparecchiature che consentono le operazioni di preparazione del materiale, piantagione, controllo di sanità, e la sua propagazione. Nello stesso tempo deve esser in grado di assicurare alla comunità scientifica nazionale e internazionale lo scambio di materiale e di informazioni sulle accessioni mantenute e sul loro stato di conservazione.

Nell'impianto e conduzione delle collezioni viventi occorre tener presente quei fattori biologici che possono compromettere la sopravvivenza di una popolazione al di fuori del suo areale di adattamento. Conseguentemente essi dovrebbero essere realizzati in ambienti simili per le condizioni pedologiche e climatiche all'ambiente di adattamento. Inoltre essi possono occupare grande spazio e debbono esser mantenute per molti anni, il che ovviamente comporta limitazioni di ordine economico e organizzativo.

In tutte le specie che debbono, per motivi diversi, esser mantenute in impianti, le limitazioni maggiori sono proprio queste: esse hanno un tale peso da portare ad una drastica riduzione del numero e delle dimensioni delle popolazioni da conservare rispetto a quanto sarebbe effettivamente necessario. Altri problemi sono invece connessi con la facilità con cui tali impianti vengono attaccati da parassiti (in particolare dai virus).

Per esse vengono pertanto raccomandate una corretta conservazione *in situ* e azioni di sostegno economico da parte della comunità internazionale ai programmi di conservazione *ex situ*.

Gli impianti *ex situ* oltre a mantenere la diversità, possono essere destinati a fornire materiale di propagazione clonale.

Conservazione *ex situ* di parti di pianta (propaguli)

Con la conservazione di semi, polline, tessuti o meristemi si riduce notevolmente lo spazio necessario alla conservazione. Il principale aspetto positivo di tale tipo di conservazione è infatti rappresentato dal fatto che in un volume esiguo quanto al limite può esser quello di un frigorifero possano esser conservati milioni di geni.

La conservazione di semi

Il poter conservare seme dove è possibile rappresenta un indubbio vantaggio perchè esso è un propagulo in cui i processi vitali e le dimensioni sono ridotti.

È infatti spesso difficile conservare un numero adeguato di piante vive, specie quando si tratti di piante che raggiungono grandi dimensioni, inoltre la conservazione del seme è una misura di protezione della variabilità genetica poco soggetta ai rischi di una alterazione dell'ambiente dovuta a motivi climatici e socio-economici più vari (dal cambiamento di un governo, all'interesse di deforestare, allo scoppio di una guerra).

Infine è poco costoso in termini di spazio e di mantenimento e consente un facile scambio di materiale.

Quando opportunamente conservato il seme di molte specie si mantiene vitale a lungo (anche decine di anni). Inoltre, la possibilità di conservare un gran numero di genotipi in uno spazio limitato e controllato per temperatura e umidità, con relativa facilità, rappresenta un altro indubbio aspetto positivo.

Attraverso il seme si può pertanto conservare il massimo numero di genotipi con la spesa più limitata.

Tuttavia il seme invecchia e con l'invecchiamento perde di vitalità. Le alterazioni di vitalità del seme che si osservano durante il suo invecchiamento sono strettamente legate ad alterazioni del materiale ereditario (una elevata percentuale di aberrazioni cromosomiche viene infatti messa in evidenza in preparati citologici da seme ormai vecchio). È necessario perciò, periodicamente, provvedere alla cosiddetta 'rigenerazione' del materiale conservato, il che ovviamente, comportando dei costi, rappresenta una limitazione.

Una lunga conservazione del seme si può ottenere, nei semi cosiddetti "ortodossi", principalmente riducendo temperatura e umidità, i principali fattori di invecchiamento, e, secondariamente, riducendo gli scambi gassosi fra seme ed ambiente di conservazione (si veda più avanti).

Molte specie di grande interesse forestale, da frutto e tropicali e alcune specie dei climi temperati con semi oleosi hanno, tuttavia, semi che mantengono la loro vitalità per un periodo di tempo molto limitato o non sopportano la disidratazione (specie con semi cosiddetti "recalcitranti"). Per queste specie la conservazione del germoplasma deve esser pertanto condotta con altre modalità.

Equazioni ragionevolmente accurate, anche per un medio periodo di conservazione (10-20 anni), sono state usate per preparare normografi in cui leggere quando è necessario rigenerare un'accessione conservata a determinate condizioni di umidità e temperatura.

Per i semi ortodossi, Ellis e Roberts (1980) hanno formulato tre equazioni che legano la vitalità del seme alla temperatura di conservazione e all'umidità del seme.

In base a quanto previsto dalle su menzionate equazioni e ad evidenze sperimentali si pensa che i semi ortodossi si conservino per centinaia di anni a temperatura di -18°C e umidità relativa interna del seme del 5-6% quando essi siano sigillati in contenitori a tenuta stagna che evitino scambi gassosi con l'ambiente esterno. Questi sono gli standard e cui si attengono le banche di germoplasma per conservare semi nel lungo periodo.

Si tratta di un sistema molto semplice e quindi facile a realizzarsi e poco costoso: nello spazio di un freezer si possono conservare milioni di geni.

Semi ortodossi, tuttavia, si possono conservare per decine di anni anche a +5°C e 5-7% di umidità relative in contenitori sigillati (conservazione a medio termine).

Moltissime informazioni relative alla conservazione dei semi di specie spontanee possono essere trovate nel Seed Information Database dei Royal Botanic Gardens di Kew, UK, (<https://data.kew.org/sid/sidsearch.html>) e per le coltivate in "Manual for seed handling in gene banks" (Rao et al., 2006) e "Handbook for seed storage behaviour: a compendium" (Hong et al., 1996). Questa pubblicazione oltre alle informazioni relative ai semi di diverse specie (condizioni per valutarne la germinabilità e per conservarli) riporta come le attrezzature debbano essere commisurate alle dimensioni delle collezioni, progettate, servite, mantenute e condotte, quali precauzioni debbano essere prese per mantenere l'integrità delle collezioni e infine quanto tutto questo venga a costare.

Nuove prospettive per la conservazione di semi vengono poi offerte dalla possibilità di conservare il seme in azoto liquido (crioconservazione a -196°C) in quanto più basse temperature, riducendo ulteriormente i processi vitali del seme, possono permettere la sua conservazione per periodi ancora più lunghi (<https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php/procedures-mainmenu-242/conservation-mainmenu-198/cryo-bank-mainmenu-201>). È da notare, tuttavia, che questo non è un sistema praticabile attualmente su larga scala perché più costoso e perché esistono problemi connessi con il danneggiamento che i tessuti subiscono con il drastico abbassamento della temperatura. Questo danneggiamento può poi rendere necessario un passaggio in vitro dei semi danneggiati, con ulteriori problemi.

Su questo tipo di conservazione molto si sta studiando per le piante che hanno semi recalcitranti. Per essi sono stati inoltre suggeriti sistemi di conservazione in anidride carbonica o in imbibizione (Villiers 1975).

La conservazione *in vitro*

Negli ultimi anni sono state sviluppate procedure per la costituzione di collezioni viventi *in vitro*. Per coltura in vitro s'intende l'applicazione biotecnologica in cui cellule, tessuti ed organi sono coltivati in un ambiente sterile ed artificiale ed in condizioni chimico-fisiche controllate permettendo anche la rigenerazione di un individuo completo partendo da cellule e/o tessuti differenziati. La conservazione in vitro può essere un mezzo di conservazione per le specie che hanno semi recalcitranti.

Le collezioni *in vitro* presentano un sostanziale vantaggio rispetto a quelle in campo: in esse il controllo sulla sanità è più stretto, rispetto al campo, ed è più difficile perdere materiale a causa di malattie; gli scambi di materiale in conservazione sono, per lo stesso motivo, facilitati.

È da notare inoltre che in uno spazio molto limitato possono essere conservati *in vitro* moltissimi genotipi.

Esse, tuttavia, presentano alcuni aspetti negativi che rendono le tecniche di conservazione *in vitro* solo strategie di conservazione complementari a quelle in campo e alla conservazione *in situ*.

Le colture *in vitro* infatti mantengono singoli genotipi e non popolazioni (quindi solo parte della diversità genetica), non consentono di valutare i materiali conservati, richiedono di essere rigenerate ad intervalli ed infine necessitano di essere adattate non solo alla specie, ma anche ai singoli genotipi di una stessa specie perché questi, spesso, rispondono diversamente alla medesima tecnica (Reed et al., 2004).

Tipi di colture adatte alla conservazione in vitro

Un ampio campione di cellule e colture tissutali sono stati valutati per verificarne l'adattabilità alla conservazione in vitro.

Se si vuole preservare germoplasma in sicurezza è imperativo scegliere un sistema che minimizzi i rischi di mutazioni, pertanto da quando esse sono state notate nei calli e nelle piante rigenerate da calli, maggior enfasi è stata posta nell'utilizzazione di meristemi o apici vegetativi.

Le colture di meristemi sono preferibili per iniziare una coltura in vitro se vogliamo colture virus-esenti: se le piante presentano virus, infatti, gli apici vegetativi produrranno piante infette.

Tuttavia se l'eliminazione dei virus non è necessaria, gli apici vegetativi costituiscono l'espianto preferito, in quanto essi sono più facilmente ottenibili che non i meristemi e hanno inoltre minori richieste di mezzo nutritivo. C'è anche stato un certo interesse nella conservazione di colture embrionali somatiche e zigotiche; comunque il lavoro in questo settore è limitato.

Apici, embrioni, cellule possono essere cresciuti *in vitro* in sistemi a crescita rallentata che permettono di rilassare i tempi fra le necessarie rigenerazioni, ovviando così, almeno in parte, ad uno dei principali problemi di questo tipo di conservazione.

Sistemi in vitro a crescita rallentata

Cellule e colture tissutali cresciute sotto condizioni ottimali seguono uno schema tipico di crescita; si ha all'inizio un periodo di lenta crescita (lag period), quindi una fase di crescita rapida durante la quale il numero di cellule cresce in modo esponenziale; infine la coltura entra in una fase di crescita stazionaria in cui rimane costante il numero delle cellule.

Questa fase di crescita stazionaria è causata dall'esaurimento di uno o più nutrienti critici del mezzo di coltura; a questo punto se si trasferiscono i tessuti cellulari in un mezzo fresco essi probabilmente moriranno.

Il tempo che impiega la coltura a passare dal periodo di crescita lenta a quella stazionaria dipende da vari fattori ma in genere varia da 1 a 6 settimane, secondo specie e tipi di coltura.

Così, in genere, una coltura *in vitro* deve essere rinnovata ogni mese (subculturata) e il mantenimento di cellule e tessuti diventa un'operazione ad elevata richiesta di manodopera.

Tuttavia modificando le condizioni in cui viene cresciuta la coltura è possibile aumentare l'intervallo tra le subcolture e ridurre quindi le esigenze di mantenimento.

Queste tecniche per ridurre la crescita cellulare (slow-growth systems) se diminuiscono le esigenze di manodopera nelle colture *in vitro*, non le eliminano però del tutto.

La velocità di crescita di una coltura *in vitro* può essere ridotta con diversi fattori usati singolarmente o in combinazione (see Ashmore 1997).

Quello più comune è l'abbassamento di temperatura; le colture di molte piante delle zone temperate in genere crescono meglio a 20-25°C, mentre la riduzione a 6-12°C riduce significativamente la velocità di crescita, mentre colture di alcune piante tropicali crescono meglio a 30°C e per queste è opportuno ridurre la temperatura di crescita a 20°C (Reed et al., 2004).

In un esperimento fatto su colture di germogli in sei specie di *Solanum*, con una riduzione di temperatura da 22°C a 6°C si è ottenuta una percentuale di sopravvivenza del 29%. Tuttavia una temperatura di 12°C di giorno e 6°C di notte aumentava in media la percentuale di sopravvivenza delle sei specie all'83% (Wescott, 1981).

Su colture di gemme ascellari di *Ipomoea batatas* L. un abbassamento di temperatura da 28°C a 22°C ha allungato il periodo necessario per la subcoltura da 6 a 55 settimane e la riduzione dell'evaporazione del mezzo ha permesso di incrementare l'intervallo di subcoltura a 89 settimane (Jarret e Gawel 1991).

Altri fattori possono inoltre influire sulla velocità di crescita di una coltura: sostanze chimiche come per es. regolatori di crescita che agiscono ritardando l'accrescimento dei tessuti (ABA, BAP, ecc.) e composti osmotici che riducono la velocità di assorbimento delle sostanze nutritive dal mezzo di coltura (mannitolo, glucosio, carbone attivo) (Whiters, 1989, 1995; Whiters e Alderson 1986; Ng e Ng, 1991; Bertrand-Desbrunais et al. 1991).

In particolare per il melo, Wilkins et al. (1988) hanno ottenuto oltre 12 mesi di conservazione senza subcolturare e senza perdita sostanziale di materiale utilizzando un mezzo di proliferazione con carbone attivo e condizioni di conservazione di 4°C e 16h di fotoperiodo. L'aggiunta di mannitolo o di altri ritardanti chimici al mezzo ha dato una risposta dipendente dalla cultivar. Simili risultati sono stati ottenuti nella stessa specie da Negri et al. (1995). Orlikowska, (1992), è riuscita a conservare, senza subcolturare, portainnesti nanizzanti di melo per oltre 8 mesi in un mezzo di accrescimento normale a 4°C in assenza di luce; lo studio ha dimostrato che la sopravvivenza oltre le 12 settimane era assicurata dalla presenza di benzil-ammino-purina (BAP).

Per i germogli di *Solanum* l'aggiunta di 5-10 mg/l di ABA al mezzo nutritivo ha permesso alle colture di essere di essere tenute a temperatura normale (22°C) per più di 12 mesi con una percentuale di sopravvivenza del 63% (Reed et al., 2004).

Ritardanti di crescita vengono spesso usati insieme a temperature ridotte. Per esempio i germogli di cassava cresciuti a temperatura ridotta (20°C) con una soluzione al 4% di glucosio e 0.01 mg/l di BAP o con un'altra soluzione al 2% di glucosio e 0.05 mg/l di BAP sono sopravvissuti per il 95%, con un intervallo di subcoltura pari a 15 mesi (Mafla et al., 2009).

Il tempo intercorrente tra le subcolture può essere aumentato anche evitando l'esaurimento del mezzo. In *Solanum* i germogli sono stati conservati in 60 ml di mezzo mentre per i controlli era di 20 ml; quando tale trattamento è stato combinato con una riduzione di temperatura a 10°C le colture si sono conservate per 18 mesi con una percentuale di sopravvivenza di oltre il 100% per qualche specie (Wescott, 1981).

In un altro studio meristemi di fragola (*Fragaria* spp.) sono stati conservati in un frigo, al buio a 4°C e controllati ogni tre mesi; ogni volta venivano aggiunte 1-2 gocce di mezzo ad ogni coltura che mostrava segni di essiccazione. Queste colture si sono mantenute per più di sei anni e le piante da esse cresciute sembravano normali (Mullin et Schlegel, 1976).

I sistemi di crescita rallentata hanno avuto successo nel ridurre le esigenze di mantenimento per le colture *in vitro*, tuttavia non hanno eliminato la necessità di subcoltura. Inoltre, a causa della continua divisione cellulare nelle colture mantenute sotto condizioni sub-ottimali, e sebbene essa avvenga a velocità ridotta, esiste il pericolo di mutazioni; così i sistemi di crescita rallentata non sono adatti ad una conservazione dei materiali di lungo periodo ma solo per la conservazione di corto-medio termine (Reed et al., 2004).

La crioconservazione

Crioconservazione è un termine che indica l'azione di mantenere del materiale biologico (semi, embrioni, meristemi, polline, cellule, protoplasti) a bassissime temperature, generalmente la temperatura dell'azoto liquido (-196°C), in modo tale che mantenga la vitalità dopo lo scongelamento (Reed et al., 2004).

La conservazione queste temperature bassissime consente l'arresto delle funzioni metaboliche dei materiali biologici mantenendone inalterata le potenzialità vitali. Infatti temperature prossime a -139°C permettono l'arresto di tutti i processi biochimici e biofisici, tuttavia i materiali biologici quando vengono sottoposti a basse temperature subiscono modificazioni di carattere fisico e biochimico che ne possono anche compromettere la vitalità, il che rappresenta una limitazione nell'applicazione di questa tecnica di conservazione

Al fine di individuare delle strategie che possano evitare o limitare queste modificazioni negative è importante conoscere cosa accade quando un materiale è sottoposto al congelamento.

Qui di seguito si forniscono le indicazioni utili alla costituzione e al mantenimento di una Banca del germoplasma finalizzata alla conservazione del seme di popolazioni di spontanee e che sia ben organizzata, funzionale e di facile gestione.

Gestione di una banca di germoplasma

1. Ingresso nella banca del germoplasma e dati di passaporto

Ogni campione (i.e. ogni 'accessione') deve avere un buono stato fitosanitario per essere inserito nella Banca. All'arrivo ogni accessione viene messa in quarantena, per un periodo variabile, e osservata per controllare l'eventuale svilupparsi di muffe, fitopatogeni e/o fitofagi dannosi.

Se, dopo il periodo di quarantena, lo stato fitosanitario dell'accessione è giudicato idoneo, si procede alla registrazione dell'accessione assegnandole un numero progressivo (il 'numero di accessione'), identificativo ed esclusivo dell'accessione stessa (se essa viene estinta il numero non è riassegnabile).

A tal proposito la Banca dovrà essere fornita di un archivio (preferibilmente informatico) dove registrare, in singole schede, tutte le informazioni relative a ciascuna accessione conservata. Ogni scheda deve essere costantemente aggiornata e dovrà contenere almeno le seguenti informazioni (dati di passaporto):

- il numero di accessione,
- il nome del taxon,
- la data di ingresso nella Banca,
- luogo di raccolta (Regione, Provincia, Comune, Vocabolo),
- lo status del materiale, se cioè si tratta di materiale spontaneo o altro (varietà locale, cultivar, linea da selezione etc.)
- il numero di propaguli vegetativi o la quantità di seme,
- se si conserva seme, la percentuale di germinabilità dello stesso.

Altre informazioni possono essere aggiunte, per completezza, relativamente alle caratteristiche pedoclimatiche dell'ambiente di raccolta.

Notevole importanza ha il numero dell'accessione; questo è un elemento di tracciabilità e rintracciabilità, deve sempre accompagnare il campione al quale è stato assegnato, deve essere presente su tutte le schede cartacee ed informatizzate relative all'accessione, nelle etichette, nelle relazioni e nelle eventuali analisi, permettendo in ogni momento di poter ricostruire la cronistoria del materiale.

Se si conserva seme, le dimensioni del campione che andremo a conservare devono essere pari, al minimo, a 2500 semi (per popolazioni molto variabili) e 5000 semi (per popolazioni poco variabili), ma è preferibile stoccarne il doppio. È infatti importante che la dimensione del campione sia sufficiente a garantirne rappresentatività, possibilità di caratterizzazione e di distribuzione; se così non fosse, prima di procedere allo stoccaggio, è necessaria una moltiplicazione preliminare, che mira ad aumentare la quantità di seme. In tal caso è necessario moltiplicare il campione in condizioni tali da non alterare l'identità genetica, cioè in isolamento da altre piante/popolazioni della stessa specie e con un numero di piante sufficientemente elevato (vedi punto 4). Secondo gli standard internazionali sarebbe altrettanto necessario che la vitalità (o germinabilità del seme) iniziale sia pari, al minimo, all'85%. Per determinare la vitalità del campione di seme delle specie che hanno anche una importanza agronomica, e sono quindi maggiormente conosciute (es. *Lolium perenne*), si sottopone questo a un test di germinabilità del quale termini di durata, numero di semi, livello dell'umidità e temperature sono stabiliti dall'International Seed Testing Association (ISTA). Informazioni più dettagliate sui vari metodi di determinazione della vitalità di un campione di semi si possono reperire nell'International Rules for Seeds Testing (<https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing-rubric-3.html>).

Al contrario molte specie spontanee hanno semi che non germinano immediatamente oppure non possono essere pienamente valutate sotto questo aspetto perché non sono note le condizioni ottimali in cui valutarne la germinabilità. Tuttavia al sito <https://data.kew.org/sid/sidsearch.html> sono reperibili dati sulle condizioni per determinare la germinabilità di molte specie spontanee, germinabilità media e altri dati (morfologia e peso medio dei 1000 semi, dispersione dei semi, loro contenuto in oli e proteine, tolleranza alle condizioni di salinità). Completate queste operazioni il materiale è pronto per essere posto in conservazione.

2. Conservazione

La conservazione della diversità genetica non è soltanto acquisizione e stoccaggio di seme, piante o parti di pianta, l'obiettivo più importante è assicurare la vitalità dei materiali conservati nel tempo.

Nella conservazione di piante bisogna fare attenzione alla scelta del luogo dove sarà svolta la conservazione perché ovviamente specie diverse hanno esigenze diverse in termini pedologici e climatici e, dopo l'impianto, alla corretta nutrizione delle piante, alla difesa da agenti biotici che possono aggredirle, a evitare che siano

soffocate da altre piante, in altri termini è necessaria una costante cura dell'impianto stesso con i costi di manutenzione connessi.

Quando si conservano in vitro parti di piante è necessario provvedere ad individuare le condizioni di temperatura e illuminazione e i mezzi di coltura più adatti, a prontamente cambiarli quando necessario e evitare che muffe attacchino le colture stesse. Nessun particolare problema durante una crioconservazione, a parte la necessità di cambiare periodicamente l'azoto liquido, mentre problemi si verificheranno al momento dell'estrazione dei campioni dalle condizioni di conservazione.

Nella conservazione di seme assicurare la vitalità nel tempo è più facile e meno costoso che nel caso di conservazione di piante o parti di pianta, semplicemente controllando le condizioni di stoccaggio delle accessioni, in particolare umidità e temperatura, in modo tale da ridurre quanto più possibile i processi metabolici del seme. È necessario sapere però che non tutti i tipi di semi possono essere conservati nelle condizioni sopra descritte. I cosiddetti 'semi recalcitranti' possono essere conservati solo per brevi periodi.

Tre sono i punti essenziali per la conservazione dei semi: 1) condizionamento, 2) confezionamento e 3) 'stoccaggio' in ambiente controllato (Fig.1 a,b,c,d).

- 1- Scopo del condizionamento è ottenere un campione pulito e a basso livello di umidità, si tratta quindi di una sanificazione e di una disidratazione.

Le operazioni di sanificazione consistono in una rigorosa pulizia del seme eliminando impurità, insetti, semi infetti, danneggiati o estranei.

La disidratazione mira invece a ridurre l'umidità ad un livello che sia il minimo richiesto dalle attività metaboliche vitali del seme. Lo standard delle Banche di germoplasma è il 6% di umidità interna del seme. La disidratazione avviene in camere di disidratazione dove, con accorgimenti e apparecchiature diverse, agendo sulla temperatura e l'umidità dell'aria, il seme perde via via la sua umidità interna. Prima della disidratazione sarebbe necessario determinare il contenuto iniziale di umidità del campione. L'avvenuta disidratazione dovrebbe essere confermata da una misurazione successiva al trattamento. I tempi e le temperature devono essere attentamente stabiliti per evitare che il procedimento leda la vitalità del seme.

- 2- Il confezionamento è l'operazione che precede lo stoccaggio, molti sono i tipi di contenitori che si possono utilizzare (fiale di vetro, barattoli, sacchetti, buste), chi gestisce la banca del germoplasma è libero di preferire quelli che vuole, importante è che sia garantita la capacità di isolare il seme dall'ambiente esterno (luce, aria, umidità ed eventuali agenti contaminanti); i contenitori migliori tuttavia sono le buste di alluminio da sigillare sottovuoto.

- 3- La metodologia di stoccaggio delle accessioni, preparate come descritto sopra, dipende dalle specie collezionate, dagli obiettivi preposti dal progetto di conservazione e dal periodo di stoccaggio che questo prevede.

In generale i parametri che interessa mantenere costanti sono: la temperatura, l'umidità relativa e il buio; la Banca del germoplasma dovrà quindi essere dotata di attrezzature che ne consentano il controllo.

I semi di molte specie (quelle che hanno semi ortodossi) possono essere conservati per un tempo praticamente indefinito (centinaia di anni, conservazione per il lungo periodo), quando disidratati fino al 6% di umidità del seme, posti in contenitori di alluminio sigillati sottovuoto e mantenuti a temperature comprese fra i -18°C e i -20°C. Allo scopo si possono usare dei normali freezer.

Se si intende mantenere le accessioni per medio periodo (10 – 20 anni), è sufficiente conservare a temperatura fra gli 1°C e i 4°C, sempre comunque in contenitori sigillati e con umidità del seme del 6%.

Se il materiale deve essere conservato solo per il breve periodo non è indispensabile disidratare il seme e poi mantenere bassa la sua umidità, è sufficiente una stanza fresca (o dotata di aria condizionata in estate) e asciutta.

Molto importante è garantire la costanza dei parametri di conservazione prefissati (temperatura, umidità relativa e buio), quindi sono necessari pannelli di controllo mediante i quali sia sempre possibile controllare le condizioni, nonché accortezze che riducano al minimo i rischi dovuti ad eventuali black-out e guasti (come sistemi di refrigerazione di soccorso indipendenti da quello principale o generatori di energia elettrica che garantiscano un regolare funzionamento nel caso venga meno l'apporto dall'impianto principale).

3. Caratterizzazione e valutazione

La caratterizzazione del germoplasma consiste in una dettagliata e sistematica descrizione delle accessioni, rilevando tratti caratteristici in grado di distinguere accessioni della stessa specie.

Si identifica quindi una serie di tratti (detti 'descrittori' o *descriptors*), che siano peculiari della specie in analisi, si esprimano in maniera precisa ed uniforme, siano ben distinguibili ad occhio nudo e facilmente registrabili, abbiano alta ereditabilità, alto valore tassonomico (in qualche caso anche agronomico), siano applicabili su piccoli campioni così da permettere di distinguere una accessione da un'altra. L'insieme di questi caratteri costituisce la lista di *descriptors* delle specie, ognuno dei quali deve essere rilevato allo stadio fisiologico opportuno. Questi sono generalmente disponibili per specie che abbiano anche un valore agronomico (es. *Lolium perenne*) che sono maggiormente conosciute, ma indisponibili per la maggior parte delle specie spontanee.

L'accessione viene caratterizzata in pieno campo, in condizioni che favoriscano uno sviluppo uniforme, a piante spaziate, all'interno di parcelle ben identificabili e randomizzate, e, possibilmente, includendo una o più varietà come controlli.

Ogni stadio della coltura viene osservato e descritto, i dati vengono registrati in modo da facilitare la loro successiva elaborazione statistica.

La popolazione sottoposta a caratterizzazione dovrebbe rappresentare la totalità della variabilità genetica e i tratti caratteristici dell'accessione coinvolta. In termini di variabilità genetica un campione rappresentativo dell'accessione dovrebbe contenere almeno il 95% degli alleli presenti. Le dimensioni del campione possono variare in dipendenza del tipo di riproduzione della specie: se abbiamo una specie allogama è generalmente ritenuto necessario utilizzare un campione di dimensioni maggiori rispetto a quello da utilizzare per una autogama. Tuttavia, come regola generale, un campione più grande e più rappresentativo e sarebbe opportuno caratterizzare almeno 50 piante singole per accessione.

Al momento dell'osservazione in campo si registrano tutti i dati relativi ad ogni singola pianta, si elaborano poi statistiche descrittive come medie, errore standard e coefficiente di variabilità.

Per le specie che sono importanti per aspetti agronomici, una volta note le caratteristiche morfologiche e fisiologiche, si può passare alla fase di valutazione. La valutazione consiste nel descrivere le accessioni in condizioni agronomiche e in prove replicate con controlli da condurre nel maggior numero di ambienti possibile. Ciò allo scopo di mettere in risalto le differenze fra accessioni, poter individuare quelle che possono essere utilizzabili immediatamente e identificare eventuali risposte positive a particolari condizioni. Per avere quantità di seme sufficiente alla valutazione è spesso necessario moltiplicare l'accessione (vedi punto 4).

Molto importante, in fase di valutazione, è la gestione delle parcelle, la registrazione di tutti i dati e la loro elaborazione statistica.

4. Moltiplicazione e rigenerazione

Durante il periodo di permanenza all'interno della banca del germoplasma, le singole accessioni possono diminuire in quantità (perché utilizzate o distribuite ad altre Banche di germoplasma) e possono perdere in vitalità (come normale processo fisiologico di invecchiamento del seme a seguito del trascorrere del tempo). Questo, ovviamente, compromette l'opera di conservazione. Prima che ciò si verifichi la/le accessioni vengono moltiplicate.

Nella conservazione di piante o parti di pianta l'operazione di moltiplicazione dipende sia dalla specie che dalle tecniche con cui si è effettuata la conservazione. È relativamente semplice per le specie che autonomamente si propagano per via vegetativa o da cui sia facile ottenere materiali per la propagazione vegetativa. Per quello che riguarda le tecniche di conservazione può essere anche molto difficile rigenerare piante intere da colture in vitro (che sono anche necessarie quando si operi crioconservazione) perché non solo i protocolli di conservazione, come detto, ma anche i protocolli di rigenerazione di piante debbono essere studiati ad hoc per la specie in questione. Per le spontanee sono entrambi assai poco (o per niente) conosciuti.

Nella conservazione di seme incrementare la quantità di seme è spesso necessario quando si intenda fare una valutazione della accessione. Più esattamente: si parla di moltiplicazione quando sia necessario incrementare la quantità di seme dell'accessione per averne quantità sufficiente alla conservazione o condurre la caratterizzazione e la valutazione, di rigenerazione quando si deve ripristinarne la germinabilità minima prevista dagli standard.

Come tutte le altre operazioni da svolgersi all'interno della banca del germoplasma pure la rigenerazione/moltiplicazione prevede procedure standard.

La decisione di moltiplicare e/o rigenerare viene presa dopo controlli sulle dimensioni e vitalità di ogni singola accessione. La dimensione è facilmente monitorabile quando, dopo l'iniziale stoccaggio, si sia tenuta nota delle quantità eventualmente distribuite/utilizzate. Riguardo la vitalità è necessario procedere periodicamente a test di germinabilità. Quando la germinabilità del campione cala al di sotto dell'80% l'accessione necessita di essere rigenerata.

Rigenerazione e moltiplicazione del seme sono molto importanti, ma non possono essere fatti con molta frequenza, perché sono operazioni dispendiose e rischiose per l'integrità genetica dell'accessione.

Nel caso si decida di procedere alla moltiplicazione e/o rigenerazione si deve seminare la popolazione in un sito idoneo e la coltura va mantenuta in condizioni che permettano l'ottenimento di una accessione vitale, sana, in quantità sufficiente per lo stoccaggio e geneticamente il più simile possibile all'originaria; il tipo di riproduzione della specie determina le modalità da adottare.

Specie prevalentemente autogame, generalmente vengono moltiplicate e/o rigenerate in pieno campo senza controllo dell'impollinazione. Da notare, tuttavia, che il sistema riproduttivo di una specie è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali locali. Ad esempio, in una specie coltivata prevalentemente autogama come *Phaseolus vulgaris*, la percentuale di allogamia può superare il 60%. Nel caso di specie allogame, che si avvalgono dell'impollinazione incrociata, per evitare incroci non desiderati e conseguente inquinamento del germoplasma, si preferisce moltiplicare e/o rigenerare la popolazione in isolamento.

Per ottenere accessioni di buona qualità e geneticamente il più simili possibile a quella di origine, è necessario uno stretto controllo delle condizioni in cui viene condotta la rigenerazione/moltiplicazione.

Innanzitutto è necessario che il numero di piante sia sufficientemente elevato. Maggiore è il numero di piante e minore è il rischio di alterare le frequenze geniche dell'accessione. In ogni caso è opportuno non scendere sotto le 50 piante in moltiplicazione/rigenerazione per ciascuna accessione.

L'accessione durante la moltiplicazione e/o rigenerazione può poi incorrere in condizioni ambientali avverse, sia di origine biotica che abiotica, che possono favorire solo certi genotipi. A tal proposito è necessario che il sito scelto abbia le giuste caratteristiche climatiche, di suolo e di disponibilità idrica, che sia possibile intervenire contro i parassiti, che le piante siano allevate a spazature tali da garantire la massima fioritura e allegagione.

Ancora, al momento della raccolta del seme, è necessario adottare tutti gli accorgimenti utili a non rovinarlo. Questi dipendono dalla specie in moltiplicazione (il cui seme può essere più o meno suscettibile a certi procedimenti di raccolta piuttosto che ad altri) come dalle tecniche e dagli strumenti meccanici di raccolta. E' quindi necessaria una buona conoscenza di entrambe.

Infine è necessario fare la massima attenzione, al momento della raccolta, che la semente non si mescoli con altro materiale proveniente da altre accessioni in moltiplicazione.

Come in tutte le operazioni di conservazione del germoplasma, per evitare confusione, perdita o mescolanza di semi, anche nel caso della moltiplicazione/rigenerazione è importante identificare con precisione ogni campione. Anche le particelle devono essere marcate e ben distinguibili l'una dalle altre; questo è particolarmente importante quando si moltiplichino contemporaneamente molte accessioni.

Terminata la moltiplicazione /rigenerazione bisogna controllare la vitalità e la dimensione del campione (come al momento dell'ingresso nella banca del germoplasma), i risultati faranno da riferimento per i prossimi controlli, quindi si procede a introdurre l'accessione rigenerata/moltiplicata nella Banca seguendo le stesse procedure descritte in precedenza (punti 1 e 2). All'accessione rigenerata/moltiplicata non va riassegnato lo stesso numero di accessione della originaria, ma un numero diverso.

5. Gestione delle informazioni

La conservazione del germoplasma prevede, in ognuna delle sue fasi, una serie di attività per le quali è necessario raccogliere informazioni o che generano informazioni. Queste sono in genere riferite direttamente alla specie (es: luogo di raccolta, riferimenti tassonomici) o alle attività che l'hanno coinvolta (es: stoccaggio, test di vitalità, moltiplicazione, rigenerazione); si tratta di informazioni molto importanti, che permettono di capire e gestire al meglio il materiale che stiamo conservando. È necessario quindi che tutti questi dati siano conservati ed organizzati in modo razionale e funzionale, possibilmente in un sistema informatizzato (Fig. 1e).

Siccome la mole di informazioni che si raccoglie può essere imponente, al fine di facilitarne la consultazione, la si può dividere in 4 categorie: Informazioni generali riguardanti la specie e la varietà; informazioni sul sito dove è stata reperita e sull'ambiente dove si sviluppa; informazioni ottenute con la caratterizzazione, valutazione e gestione; informazioni di carattere antropologico legate alla varietà locale/specie spontanea.

I dati relativi alla varietà, al sito di raccolta e all'ambiente vengono raccolti in larga parte durante il collezionamento, in questa fase l'operatore avrà cura di registrare tutte le informazioni necessarie, magari utilizzando schede di raccolta dati del tipo presentato nell'allegato 1.

Le informazioni relative alle prove di caratterizzazione e valutazione, ottenute nelle prove di cui già si è parlato, vengono generalmente inseriti come medie dei dati rilevati.

Dati relativi alla gestione del germoplasma sono quelli che derivano dalle attività di moltiplicazione preliminare, controllo della vitalità, rigenerazione, tipo di conservazione e distribuzione. Queste informazioni servono per controllare e valutare l'efficienza e la funzionalità di tutte le attività di conservazione.

Molti sono i sistemi possibili che consentono di raccogliere la mole di informazioni necessaria ad una corretta gestione della Banca. Essi possono basarsi su supporti cartacei e/o informatici, l'importante è che il sistema scelto permetta ai dati di essere organizzati, registrati, analizzati e mantenuti in maniera funzionale, sicura e di facile consultazione.

Per essere efficiente il sistema deve includere solo informazioni esatte, complete e verificate, permettere un rapido reperimento dei dati raccolti, essere di facile gestione, essere flessibile in modo tale che lo si possa adattare facilmente in caso di cambiamenti strutturali futuri, essere organizzato in categorie in modo da rendere più facili le registrazioni, i controlli, la consultazione e tutte le varie attività ad esso connesse.

Come già si è detto il sistema può avvalersi anche di supporti cartacei (registri, schede...), facilmente utilizzabili da tutti, che però richiedono molto tempo per le registrazioni, necessitano di spazi piuttosto ampi e non permettono la condivisione di materiale in rete.

I sistemi informatici invece riducono gli spazi, sono di più rapida compilazione, permettono di condividere materiale on-line e, se ben gestiti, danno comunque buona sicurezza di conservazione dei dati.

6. Utilizzazione e scambio di materiali ed informazioni

Una volta che la banca del germoplasma è stata creata, i semi sono in conservazione e tutti i dati che potevamo raccogliere sono registrati, analizzati ed organizzati, il compito della struttura è quello di mantenersi attiva e

funzionale, non solo continuando a raccogliere dati e confrontandoli fra loro, ma anche individuando problemi di perdita o deterioramento delle accessioni e valutando l'efficacia del programma di conservazione. Un ruolo molto importante della Banca del germoplasma è quello di promuovere l'utilizzazione del materiale conservato. Pertanto è opportuno essere disponibili a fornire o scambiare materiale di propagazione e dati con altre Istituzioni o privati. A questo riguardo, per le specie che sono anche di interesse agrario, bisogna oggi tener presente quanto disposto dall'International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture che è stato ratificati dall'Italia. Per le altre è da notare che l'Italia non ha sottoscritto il protocollo di Nagoya, e che le autorità competenti per autorizzare la raccolta e gli scambi di materiale vegetale sono ISPRA e il Ministero dell'Ambiente (competenti in particolare per le specie incluse negli Allegati II e IV alla Dir. 92/43/EEC "Habitat"), oltre ad enti competenti di scala territoriale quali le Regioni, le Province Autonome e i Parchi nazionali. Inoltre bisogna ricordare che le accessioni conservate in Banca di germoplasma possono essere utilizzate per reintrodurre specie o popolazioni nell'ambiente da cui sono scomparse. Allo scopo chi gestisce la banca del germoplasma può utilmente fare azione di divulgazione e di informazione relativamente alle accessioni conservate e di promozione della loro reintroduzione.



Figura 1 - Procedure e strumenti utilizzati per la conservazione *ex situ* presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università degli Studi di Perugia (DSA3).

SEZIONE 2 - PROTOCOLLI DI CONSERVAZIONE *EX SITU* DELLE 5 SPECIE TARGET ANNEX II-IV PRESENTI IN UMBRIA E DELLE SPECIE "H-KEY" SELEZIONATE

***Himantoglossum adriaticum* H. Baumann**

Non sono state trovate informazioni specifiche sulla conservazione del seme di *H. adriaticum*, tuttavia altre specie di orchidea delle zone temperate hanno semi ortodossi, dal che si può supporre che anche il seme di questa si possa conservare nel lungo periodo in contenitori sigillati a -18°C quando opportunamente disidratato. La specie ha anche propagazione vegetativa (vedi sez.1), pertanto singoli genotipi possono anche essere conservati come piante intere in collezioni viventi, opportunamente locate in situazioni pedoclimatiche consone alle esigenze della specie.

La conservazione *in vitro* e la crioconservazione non sono state ancora sperimentate per la specie, pertanto il tessuto più idoneo per inizializzare le colture, i mezzi di coltura e le condizioni di conservazione delle stesse dovrebbero essere definiti *ab initio* prima di poterli mettere in pratica.

Himantoglossum adriaticum è una delle specie target del Progetto LIFE20 NAT/IT/001468 "SEEDFORCE" (2021-2026), con il quale sono in programma momenti di scambio finalizzati alla condivisione delle buone pratiche sviluppate.

***Iris marsica* I. Ricci & Colas**

Non sono state trovate informazioni specifiche sulla conservazione del seme di *I. marsica* tuttavia molte specie appartenenti al genere *Iris* hanno semi ortodossi (<https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Iris&Species=&StorBehav=0>), il che fa supporre che anche questa specie abbia semi con le stesse caratteristiche e possa essere conservata per il lungo periodo con le metodologie precedentemente descritte (i.e. disidratazione al 6% di umidità interna del seme, conservazione a -18°C in contenitori sigillati).

La specie ha spiccata propagazione vegetativa, pertanto singoli genotipi possono anche essere conservati come piante intere in collezioni viventi, opportunamente locate in situazioni pedoclimatiche consone alle esigenze della specie.

La conservazione *in vitro* e la crioconservazione non sono state ancora sperimentate per la specie, ma vista la facilità con cui la specie si propaga vegetativamente e la probabile facile conservazione dei semi, non avrebbe molto senso provare queste vie.

***Adonis distorta* Ten.**

Non sono state trovate informazioni specifiche sulla conservazione del seme di *A. distorta* tuttavia molte altre specie di Ranunculaceae hanno seme ortodosso (see <https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=Ranunculaceae&APG=off&Genus=&Species=&StorBehav=0>) dal che si può supporre che anche il seme di questa si possa conservare nel lungo periodo in contenitori sigillati a -18°C quando opportunamente disidratato. Tuttavia lo scarso potenziale germinativo della specie, evidenziato da progetti analoghi (LIFE15 NAT/IT/000946 FloraNET), rende la conservazione dei suoi semi poco efficace per la salvaguardia della specie. La specie non presenta attitudine alla propagazione vegetativa. Singoli genotipi potrebbero anche essere conservati come piante intere in collezioni viventi, opportunamente locate in situazioni ecologicamente consone alle esigenze della specie, cioè situate in zone con microclimi estremi, trattandosi di una specie di alta quota.

Viste le problematiche emerse nell'ottenere risultati soddisfacenti in fase di germinazione in progetti analoghi (ad es. il LIFE15 NAT/IT/000946 FloraNET), la conservazione *in vitro* e la crioconservazione, pur non essendo ancora sperimentate per la specie, potrebbero essere ipotesi percorribili, così come l'adozione di tecniche di micropropagazione.

***Klasea lycopifolia* (Vill.) Á.Löve et D.Löve**

Non sono state trovate informazioni specifiche sulla conservazione del seme di *K. lycopifolia*, tuttavia le 8 specie di *Klasea* valutate dai Kew Royal Botanical Gardens per il tipo di seme delle specie hanno semi ortodossi (<https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Klasea&Species=&StorBehav=0>) dal che si può supporre che anche il seme di questa si possa conservare nel lungo periodo in contenitori sigillati a -18°C quando opportunamente disidratato.

Siccome la specie si propaga anche per via vegetativa mediante la produzione di rizomi (processo grazie al quale spesso sviluppa estese colonie in natura) la costituzione di collezioni viventi è facile, il loro mantenimento nel tempo però sarà condizionato dalle caratteristiche pedoclimatiche del luogo dove verrà posta la collezione.

La conservazione *in vitro* e la crioconservazione non sono state ancora sperimentate per la specie, pertanto il tessuto più idoneo per inizializzare le colture, i mezzi di coltura e le condizioni di conservazione delle stesse dovrebbero essere definite *ab initio* prima di poterle mettere in pratica.

***Ionopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcang.**

Non sono state trovate informazioni specifiche sulla conservazione del seme di *I. savianum*, tuttavia 3 specie di *Ionopsidium* il cui comportamento dei semi è stato valutato dai Kew Royal Botanical Gardens vengono individuate come specie che hanno semi ortodossi (<https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Ionopsidium+&Species=&StorBehav=0>), pertanto si può supporre che anche il seme opportunamente disidratato di questa si possa conservare nel lungo periodo in contenitori sigillati a -18°C.

La specie non si propaga vegetativamente, ma solo per seme, di conseguenza certamente si possono costituire collezioni viventi a partire da seme che però si potranno mantenere efficacemente solo quando esse siano locate in ambienti idonei alla vita della specie. Inoltre, essendo la specie a ciclo annuale, le collezioni viventi necessitano intrinsecamente di una costante rinnovazione.

La conservazione *in vitro* e la crioconservazione non sono state ancora sperimentate per la specie, pertanto il tessuto più idoneo per inizializzare le colture, i mezzi di coltura e le condizioni di conservazione delle stesse dovrebbero essere definite *ab initio* prima di poterle mettere in pratica.

In conclusione, tutte le 5 specie target di Annex II-IV appaiono suscettibili di essere conservate come seme per il lungo periodo.

H_key species

Come menzionato precedentemente, le specie che hanno semi ortodossi possono essere conservate nel lungo periodo come seme essiccandolo fino al 6% di umidità interna, sigillandolo in contenitori a tenuta stagna e ponendolo in conservazione in freezer a -18 - -20°C.

Questa tecnica è la più idonea, la più facile a realizzarsi e la meno costosa per la conservazione *ex situ* rispetto ad altre, a cui peraltro bisogna ricorrere se i semi non sono "ortodossi".

Fra le H_Key species di interesse per l'Umbria alcune sono anche di interesse agrario e non solo naturalistico (e.g. *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata* etc): per esse è ben noto che le condizioni di conservazione del seme sopra citate sono efficaci, essendoci ormai esperienza mondiale di diversi decenni in merito. La Banca di germoplasma

del DSA3 (Codice FAO: ITA 363), fra l'altro ne conserva diverse accessioni dagli anni '80 senza che se ne sia perduta la germinabilità del seme.

Più complessa è la situazione per altre H_Key species per cui sono reperibili pochi dati e unicamente provenienti dal lavoro svolto presso i Kew Royal Botanical Gardens. Tuttavia, la maggior parte di esse si ritiene abbia semi ortodossi. In Tabella 3 viene riportatao quanto è stato possibile reperire in merito alla loro reale possibilità di conservazione per il lungo periodo.

Tabella 3. Sostenibilità della conservazione *ex situ* per le H_key species target del progetto. Per le specie appartenenti alla categoria "1" le informazioni circa la possibilità di conservazione sono abbastanza ben note e la fonte bibliografica di provenienza è generalmente indicata.

Species	Suitability to long tem conservation of seeds: 1=yes, 2=no, 3=unknown, 4=unknown but presumably yes	Bibliographic references
<i>Armeria arenaria</i> (Pers.) Schult.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Armeria+&Species=arenaria&StorBehav=0
<i>Armeria gracilis</i> Ten.	3	
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. Beauv. ex J. Presl et C. Presl	1	
<i>Bellardiochloa variegata</i> (Lam.) Kerguelen	3,4	
<i>Brachypodium genuense</i> (DC.) Roem. et Schult.	3,4	
<i>Bromopsis erecta</i> (Huds.) Fourr.	3,4	
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Bromus+&Species=hordeaceus&StorBehav=0
<i>Callitriche brutia</i> Petagna	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Callitriche+&Species=brutia&StorBehav=0
<i>Campanula micrantha</i> Bertol.	3	
<i>Carex macrolepis</i> DC.	3	
<i>Catapodium rigidum</i> (L.) C.E.Hubb.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Catapodium+&Species=rigidum&StorBehav=0
<i>Centaurea nigrescens</i> Willd. subsp. <i>neapolitana</i> (Boiss.) Dostáli	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Centaurea+&Species=nigrescens&StorBehav=0
<i>Cicendia filiformis</i> (L.) Delarbre	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Cicendia+&Species=filiformis&StorBehav=0
<i>Dactylis glomerata</i> L.	1	
<i>Dactylorhiza sambucina</i> (L.) Soó	3	
<i>Danthonia decumbens</i> (L.) DC.	3,4	
<i>Daucus carota</i> L.	1	
<i>Dianthus deltoides</i> L. subsp. <i>deltoides</i>	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Dianthus+&Species=deltoides&StorBehav=0
<i>Euphorbia exigua</i> L. subsp. <i>exigua</i>	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Euphorbia+&Species=exigua&StorBehav=0
<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	1	
<i>Festuca inops</i> De Not.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Festuca+&Species=inops&StorBehav=0
<i>Festuca rubra</i> L.	1	
<i>Galium debile</i> Desv.	3	
<i>Hypochaeris achyrophorus</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Hypochaeris&Species=achyrophorus&StorBehav=0
<i>Isoetes histrix</i> Bory	3	

segue a pagina successiva

Species	Suitability to long tem conservation of seeds: 1=yes, 2=no, 3=unknown, 4=unknown but presumably yes	Bibliographic references
<i>Juncus bufonius</i> L.	3,4	
<i>Juncus bulbosus</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Juncus+&Species=bulbosus&StorBehav=0
<i>Juncus capitatus</i> Weigel	3,4	
<i>Juncus pygmaeus</i> Rich. ex Thuill.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Juncus+&Species=pygmaeus&StorBehav=0
<i>Juncus tenageia</i> L.f. subsp. <i>tenageia</i>	3	
<i>Lolium perenne</i> L.	1	
<i>Lotus corniculatus</i> L.	1	
<i>Luzula multiflora</i> (Ehrh.) Lej. subsp. <i>Multiflora</i>	3,4	
<i>Mentha pulegium</i> L. subsp. <i>Pulegium</i>	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Mentha+&Species=pulegium&StorBehav=0
<i>Nardus stricta</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Nardus+&Species=stricta&StorBehav=0
<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Petrorhagia+&Species=saxifraga&StorBehav=0
<i>Pilosella officinarum</i> Vaill.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Pilosella+&Species=officinarum&StorBehav=0
<i>Plantago lanceolata</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Plantago+&Species=lanceolata&StorBehav=0
<i>Poa trivialis</i> L.	1	
<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Potentilla+&Species=erecta+&StorBehav=0
<i>Ranunculus ophioglossifolius</i> Vill.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Ranunculus+&Species=ophioglossifolius&StorBehav=0
<i>Ranunculus velutinus</i> Ten.	3	
<i>Salvia pratensis</i> L.	3,4	
<i>Sedum album</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Petrorhagia+&Species=saxifraga&StorBehav=0
<i>Sedum sexangulare</i> L.	3	
<i>Senecio scopolii</i> Hoppe & Hornsch.	4	
<i>Solenopsis laurentia</i> (L.) C. Presl	4	https://data.kew.org/sid/SidServlet?ID=59646&Num=eei
<i>Taraxacum</i> F.H.Wigg. sect. <i>Taraxacum</i>	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?ID=22765&Num=9tP
<i>Tragopogon pratensis</i> L.	1	https://data.kew.org/sid/SidServlet?Clade=&Order=&Family=&APG=off&Genus=Tragopogon+&Species=pratensis&StorBehav=0
<i>Trifolium pratense</i> L.	1	
<i>Trifolium scabrum</i> L.	1	

BIBLIOGRAFIA

- Ashmore SE (1997). Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Bertrand-Desbrunais A, Noirot M & Charrier A (1991). Minimal growth in vitro conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 27, 333–339, <https://doi.org/10.1007/BF00157599>
- Ellis R, Roberts E H (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany*, 45, 13-30, DOI:10.1093/OXFORDJOURNALS.AOB.A085797
- Hong, TD, S Linington and RH Ellis (1996). Seed Storage Behaviour: a Compendium. Handbooks for Genebanks: No. 4. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Available at https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Seed_storage_behavior__a_compendium_1576.pdf
- Jarret RL, Gawel N (1991). Chemical and environmental growth regulation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 25, 153–159 <https://doi.org/10.1007/BF00042187>
- Mafla G, Roa JC, Aranzales E, Debouck D (2009). Handbook of procedures for in vitro germplasm conservation of the genus *Manihot*. CIAT, Cali, Colombia. 56 pp.
- Mullin RH and DE Schlegel (1976). Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience* 11:100–101.
- Ng NQ and SYC Ng (1999). Yam field genebank management at IITA. Pp. 16–18 in Management of Field and In Vitro Germplasm Collections, Proceedings of a Consultation Meeting, 15–20 January, 1996, CIAT, Cali, Colombia (F Engelmann, ed.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Negri V, Hammad HH, Standardi A (1995). A space saving storage technique for in vitro cultures of apple germplasm. *Journal of Genetics and Breeding* 49: 127-132
- Orlikowska T (1992). Effect of in vitro storage at 4 °C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00043468>
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M (2006). Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy, available at <https://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/manual-of-seed-handling-in-genebanks/>
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM (2004). Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections. Handbooks for Genebanks, 7. International Plant Genetic Resources Instit., Rome (Italy), pagg 107, ISBN 10:92-9043-640-9 ISBN 13:978-92-9043-640-9, available at <https://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/technical-guidelines-for-the-management-of-field-and-in-vitro-germplasm-collections/>
- Villiers TA, (1975). Genetic maintenance of seeds in imbibed storage. In *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Eds OH Frankel and JG Hawkes, pp. 297- 316. Cambridge: Cambridge University Press. V
- Westcott RJ, (1981). Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Res*24, 331–342 (1981). <https://doi.org/10.1007/BF02360370>

Withers LA (1989). *In vitro* conservation and germplasm utilisation. In: Brown ADH, Marshall DR, Franke OH & Williams JT (Eds) *The use of plant genetic resources* (pp 309-334) Cambridge University Press IIBPGR, Cambridge

Withers LA, (1995). Collecting *in vitro* for genetic resources conservation. Pp. 511–515 in *Collecting Plant Genetic Diversity* (L Guarino, VR Rao and R Reid, eds.). CAB International, Wallingford, UK.

Withers LA and PG Alderson (eds.) (1986). *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworths, London.

Siti consultati

<https://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php/procedures-mainmenu-242/conservation-mainmenu-198/cryobank-mainmenu-201>

<https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing-rubric-3.html>

<https://data.kew.org/sid/sidsearch.html>