



Deliverable C.3.1

**SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI GERMINAZIONE DI SPECIE DI INTERESSE PER LA  
REALIZZAZIONE DEL PROGETTO LIFE14 NAT/IT/000759 WETFLYAMPHIBIA (Azione C3)**

Relazione redatta da:

Thomas Abeli

Graziano Rossi

Andrea Mondoni

Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, Università degli Studi di Pavia

Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia

31 marzo 2017

## SOMMARIO

1. ATTIVITA' PRELIMINARI	1
1.1 Scelta delle specie destinate alla propagazione	1
1.2 Raccolta del germoplasma e dei propaguli	3
1.3 <i>Seed curation</i>	4
1.4 Stoccaggio a lungo termine	5
2. SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI GERMINAZIONE	5
2.1 Metodologia utilizzata nei test di germinazione	6
2.2 Informazioni disponibili	6
2.3 Risultati dei test di germinazione e protocolli di riproduzione	8
3. CONCLUSIONI	10
4. BIBLIOGRAFIA	11

## 1. ATTIVITA' PRELIMINARI

### 1.1 Scelta delle specie destinate alla propagazione

Le specie destinate alla propagazione *ex situ* e al successivo trapianto in natura nei siti di intervento sono state identificate sulla base di estesi sopralluoghi di campo facenti parte delle attività previste dall'azione A2. Tale azione, coordinata da UNIBO, ha previsto l'individuazione delle diverse tipologie di vegetazione presenti nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, con particolare riferimento alla localizzazione e composizione di habitat specifici quali l'habitat 6430 (Bordure planiziali, montane e alpine di megafornie idrofile), il Magnocaricion e l'habitat 3210 (Acque oligomesotrofe calcaree con vegetazione bentica di *Chara* spp.), così come previsto dal progetto. I sopralluoghi sono anche serviti per identificare e localizzare specie non strettamente legate agli habitat sopramenzionati, ma di interesse per la rarità o il valore conservazionistico. Tra queste le specie necessarie al sostentamento e alla riproduzione dei lepidotteri target (*Euplagia quadripunctaria* ed *Eriogaster Catax*). Nella fase di perlustrazione e descrizione del territorio dal punto di vista vegetazionale e floristico è stato importante il coordinamento tra le unità "botaniche" UNIBO ed UNIPV per meglio identificare le specie di interesse.

Le indagini di campo hanno permesso di individuare le specie che localmente caratterizzano gli habitat target a che quindi diventano particolarmente importanti nell'ottica di ripristino ambientale nei siti di intervento previsti dal progetto. Inoltre, dai risultati è emerso che l'habitat 6430 è presente all'interno dell'area di progetto in due *faces* distinte, legate alla quota. In particolare, una *faces* è riconducibile al sottotipo planiziale-collinare così come descritto dal Manuale Italiano per l'interpretazione degli habitat (Direttiva 92/43/CEE) <http://vnr.unipg.it/habitat/index.jsp>, mentre la seconda *faces* è riconducibile al sottotipo montano-alpino.

L'individuazione dei due sottotipi dell'habitat 6430 nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi è risultata del tutto inattesa rispetto alla stesura del progetto e al lato pratico comporta la necessità di maggiore diversificazione delle specie da produrre *ex situ* con qualche probabile impatto sui costi (in aumento), non ancora quantificabili. Ad esempio, il numero delle uscite destinate alla raccolta semi è stato maggiore del previsto, proprio per campionare entrambe le *faces* in modo completo. Di conseguenza, anche le attività connesse al processamento dei semi (paragrafo 1.3) sono state maggiormente dispendiose rispetto alla prevista omogeneità dell'habitat 6430, con anche un maggiore lavoro da parte del personale coinvolto.

Per ulteriori resoconti circa l'indagine vegetazionale e floristica si rimanda agli output dell'azione A2 (Relazione del 29 dicembre 2016, rivista il 20 febbraio 2017).

Sulla base, quindi, delle indagini di campo e di letteratura, 48 specie (tale numero non include le specie strettamente acquatiche che non verranno riprodotte *ex situ* e per le quali non verranno sviluppati protocolli di germinazione e coltivazione) sono risultate idonee per il ripristino della vegetazione nei siti di intervento, nonché per il rafforzamento delle esigue popolazioni di specie rare o minacciate all'interno dell'area di progetto (Tabella 1). Nello specifico, la produzione di alcuni *taxa* è stata presa in carico da UNIPV, sia

mediante coltivazione diretta presso l'Orto Botanico di Pavia (Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente), sia mediante il coinvolgimento di ditte florovivaistiche ingaggiate come “*external assistance*”. Altre specie, in particolare arbustive, sono invece state prese in carico dal Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità (ex Corpo Forestale dello Stato).

1	<i>Aconitum lycoctonum</i> L. emend. Koelle
2	<i>Adenostyles australis</i> (Ten.) Nyman
3	<i>Aegopodium podagraria</i> L.
4	<i>Alliaria petiolata</i> (M.Bieb.) Cavara & Grande
5	<i>Angelica sylvestris</i> L.
6	<i>Arabis alpina</i> (Willd.) Briq.
7	<i>Arctium lappa</i> L.
8	<i>Asphodelus macrocarpus</i> Parl.
9	<i>Caltha palustris</i> L.
10	<i>Carduus personata</i> (L.) Jacq.
11	<i>Carex hirta</i> L.
12	<i>Carex leporina</i> L.
13	<i>Carex otrubae</i> Podp.
14	<i>Carex pendula</i> Huds.
15	<i>Carex pseudocyperus</i> L.
16	<i>Carex spicata</i> Huds.
17	<i>Carex riparia</i>
18	<i>Carex strigosa</i> Huds.
19	<i>Chaerophyllum aureum</i> L.
20	<i>Chaerophyllum temulum</i> L.
21	<i>Circaea lutetiana</i> L.
22	<i>Digitalis lutea</i> L.
23	<i>Epilobium angustifolium</i> (= <i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Scop.)
24	<i>Epilobium hirsutum</i> L.
25	<i>Epilobium montanum</i> L.
26	<i>Epilobium parviflorum</i> Scrb.
27	<i>Epilobium tetragonum</i> L.
28	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.
29	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim.
30	<i>Heracleum sphondylium</i> L.
31	<i>Hypericum tetrapterum</i> Fries
32	<i>Juncus articulatus</i> L.
33	<i>Juncus conglomeratus</i> L.
34	<i>Juncus effusus</i> L.
35	<i>Juncus inflexus</i> L.
36	<i>Lunaria rediviva</i> L.
37	<i>Myosotis scorpioides</i> L.
38	<i>Peplis portula</i> L.

38bis	<i>Petasites hybridus</i> (L.) Gaertn.
39	<i>Peucedanum ostrutium</i> (L.) W.D.J. Koch.
40	<i>Pimpinella major</i> (L.) Huds.
41	<i>Podospermum canum</i> C.A. Mey
42	<i>Rubus idaeus</i> L.
43	<i>Salvia glutinosa</i> L.
44	<i>Sambucus ebulus</i> L.
45	<i>Saxifraga rotundifolia</i> L.
46	<i>Senecio ovatus</i> Willd.
47	<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.
48	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> L.
49	<i>Trollius europaeus</i> L.

**Tabella 1 – Specie ritenute utili al ripristino o ricreazione degli habitat nei siti di intervento**

## 1.2 Raccolta del germoplasma e dei propaguli

La produzione *ex situ* delle specie in tabella 1 è avvenuta o avverrà (la produzione non è completa al momento della presente relazione) principalmente mediante propagazione da seme ed in misura minore mediante propagazione vegetativa di propaguli raccolti direttamente *in situ*.

Nei primi mesi dall’inizio del progetto UNIPV ha provveduto a richiedere (ottenendole) le autorizzazioni necessarie alla raccolta di semi e piante all’interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi e all’interno delle Riserve naturali statali Casentinesi gestite dall’Ufficio Territoriale per la Biodiversità di Pratovecchio del Corpo Forestale dello Stato.

La raccolta del germoplasma, ovvero dei semi, è stata attuata dal personale di UNIPV (nello specifico da Graziano Rossi, Thomas Abeli ed Elena Rita Tazzari) durante 13 uscite di campo effettuate da giugno a ottobre 2016 in diverse aree del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi, oltre che in aree limitrofe dell’Appennino settentrionale. In quest’ultimo caso ci si è limitati alla raccolta di germoplasma di specie non protette i cui campioni raccolti nell’area di progetto hanno dato scarsi risultati di germinazione e sopravvivenza (si veda paragrafo 2.3).

La scelta di prelevare materiale anche al di fuori dell’area di progetto è comunque pienamente in linea con quanto previsto da diverse linee guida alla traslocazione di specie vegetali spontanee in ambito nazionale (Rossi et al., 2013) ed internazionale (Maschinski & Haskin, 2012).

Nella maggior parte dei casi la raccolta del germoplasma è stata eseguita seguendo l’ENSCONET *Seed Collecting Manual* (ENSCONET, 2009), così come precisato nelle primissime relazioni tecniche del progetto, che prevede che la raccolta semi venga effettuata su un numero di piante tale da garantire la massima variabilità genetica del campione, minimizzando gli effetti negativi della raccolta stessa, soprattutto per le specie presenti in piccole popolazioni.

La raccolta di propaguli è consistita principalmente nel prelievo di rizomi successivamente invasati e mantenuti *ex situ* presso l'Orto Botanico dell'Università di Pavia per la successiva propagazione vegetativa. Le specie di cui sono stati raccolti propaguli sono elencate in tabella 2.

Famiglia	Specie	N. propaguli iniziale
Ranunculaceae	<i>Aconitum lycoctonum</i> L. emend. Koelle	90
Asteraceae	<i>Adenostyles australis</i> (Ten.) Nyman	40
Lamiaceae	<i>Ajuga reptans</i> L.	30
Rosaceae	<i>Alchemilla</i> sp.	39
Woodsiaceae	<i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth	4
Ranunculaceae	<i>Caltha palustris</i> L.	17
Cyperaceae	<i>Carex leporina</i> L.	80
Cyperaceae	<i>Carex strigosa</i> Huds.	125
Apiaceae	<i>Chaerophyllum aureum</i> L.	10
Onagraceae	<i>Chamaenerion angustifolium</i> (L.) Scop.	3
Apiaceae	<i>Heracleum sphondylium</i> L.	6
Juncaceae	<i>Juncus articulatus</i> L.	220
Juncaceae	<i>Juncus effusus</i> L.	11
Brassicaceae	<i>Lunaria rediviva</i> L.	14
Boraginaceae	<i>Myosotis scorpioides</i> L.	12
Lythraceae	<i>Peplis portula</i> L.	100
Asteraceae	<i>Petasites hybridus</i> (L.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.	91
Asteraceae	<i>Senecio ovatus</i> (G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) Willd.	1
Ranunculaceae	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> L.	5

**TABELLA 2 – Specie coltivate *ex situ* presso l'Orto botanico dell'Università di Pavia alla data della presente relazione**

Al contempo anche il Centro Nazionale Carabinieri Biodiversità di Pratovecchio ha raccolto germoplasma e propaguli, poi coltivati presso il Centro Nazionale per lo studio e la conservazione della Biodiversità Forestale di Pieve santo Stefano (CNBF). Si rimanda alla relazione del CFS del 23-12-2016 per ulteriori dettagli circa il materiale allevato a Pratovecchio. Per quanto riguarda UNIPV, le informazioni circa i campioni raccolti sono riportati in apposite schede di campo disponibili come allegati on-line (Drive di progetto) alla presente relazione.

### 1.3 *Seed curation* e stoccaggio presso la Banca del Germoplasma Vegetale dell'Università di Pavia

I semi raccolti in natura e portati presso i laboratori della Banca del Germoplasma Vegetale dell'Università di Pavia sono stati sottoposti alle diverse fasi di *seed curation* a cui normalmente sono sottoposti tutti i campioni in entrata. Ad ogni campione è stato assegnato un codice univoco costituito dalle lettere PNFC e da un numero progressivo (es.: PNFC\_16\_001). Successivamente sono state svolte le operazioni di pulizia del

campione con modalità differenti a seconda della specie, ma che in sostanza possono essere riassunte come segue:

- 1) Pulizia manuale eseguita con setacci di diverse maglie a seconda della specie. Questa operazione permette di sgrossare il campione e separare i semi dal detrito più grossolano;
- 2) Pulizia mediante l'utilizzo di specifiche macchine che, per mezzo di un getto d'aria dall'intensità regolabile, consentono di separare il materiale vegetale in funzione del peso: per effetto della differenza di peso, i semi sani e vitali tendono a rimanere separati dal materiale di scarto, costituito da detrito, semi morti, immaturi o infestati. L'intensità del getto d'aria viene modulata in relazione alla dimensione e al peso dei semi che si devono pulire;
- 3) Rifinitura manuale (con l'ausilio di pinzette) per la completa separazione dei semi vitali e maturi da eventuali residui di materiale vegetale rimasto, situazione questa che si verifica soprattutto quando si lavorano semi di piccole dimensioni (es.: *Epilobium* spp. *Saxifraga* spp., ecc.), che sono estremamente simili, per peso e dimensione, al materiale di scarto che li accompagna e quindi difficilmente separabili mediante getti d'aria;
- 4) *Cut test* o test al taglio su dieci semi per ogni campione, al fine di verificare la percentuale di semi vivi, vuoti o infestati.
- 5) Peso dei semi. Mediante pesatura di 5 repliche da 50 semi ciascuna per ogni campione. Queste pesate permettono di ottenere una stima (approssimata per difetto) del numero totale di semi presenti in ciascun campione sulla base del peso totale del campione.

Le informazioni sulla *seed curation* dei semi sono riportati in apposite schede di caratterizzazione compilate dagli operatori della Banca del Germoplasma ed allegate in formato elettronico alla presente relazione.

#### **1.4 Stoccaggio a lungo termine**

Lo stoccaggio a lungo termine avviene mediante disidratazione dei semi e successivo congelamento. In accordo con i protocolli internazionali di conservazione dei semi (ISTA 2013), semi vengono dapprima essiccati a temperatura e umidità costanti di 15°C e 15% umidità relativa. L'umidità rilasciata dai semi viene costantemente controllata fino al raggiungimento di valori di equilibrio con l'ambiente di essiccazione (i.e. 15% UR). I semi così disidratati sono posti in barattoli di vetro ermetici contenenti gel di silice e posizionati in comuni freezer no-frost a -18°C. Poiché i semi raccolti nell'ambito del progetto servono primariamente per la riproduzione delle piante necessarie al ripristino della vegetazione, lo stoccaggio definitivo non è stato effettuato alla data della presente relazione. Tuttavia, una volta terminata la fase di produzione delle specie C3, una parte dei campioni di semi verrà stoccata permanentemente presso la Banca del Germoplasma dell'Università di Pavia e costituirà una riserva di materiale, che potrà essere usato successivamente per eventuali futuri interventi (es.: sostituzione fallanze). Le specie sono tutte ortodosse, quindi conservabili a lungo termine.

## 2. SVILUPPO DI PROTOCOLLI DI GERMINAZIONE

Uno degli obiettivi dell'azione C3 consiste nello sviluppo di protocolli di germinazione per le specie utilizzate nel progetto; lo sviluppo di tali protocolli è una fase fondamentale e propedeutica alla produzione vivaistica relativa al progetto stesso, ma anche per futuri interventi di *restoration ecology* con le medesime specie anche in aree diverse da quelle coinvolte nel LIFE WetFlyAmphibia.

Disponibilità di acqua, temperatura e luce sono i principali fattori che regolano la germinazione dei semi. La maggior parte dei semi germina quando vi è una disponibilità d'acqua sufficiente alla completa imbibizione, mentre la temperatura ottimale di germinazione può variare da specie a specie e talvolta da popolazione a popolazione. Tuttavia, anche quando si verificano le necessarie condizioni di imbibizione e temperatura ottimale, la germinazione dei semi può essere bloccata o ritardata da caratteristiche specie-specifiche, come ad esempio condizioni di dormienza di vario tipo (morfologica, fisiologica, ecc.; Baskin & Baskin, 2014).

Pertanto la verifica della vitalità dei semi e l'identificazione dei requisiti di germinazione specie-specifici richiede test a diverse condizioni in cui i fattori che promuovono la germinazione sono combinati in modo diverso. Lo sviluppo di protocolli di germinazione per le specie di interesse per il ripristino della vegetazione ha seguito due fasi, una di test di germinazione preliminari e una di test di germinazione specifici.

### 2.1 Metodologia utilizzata nei test di germinazione

I test di germinazione hanno seguito protocolli accettati a livello internazionale (FAO/IPGRI, 1994; ISTA 2013; ENSCONET 2009).

I test sono stati condotti seminando i semi in capsule Petri riempite con Agar – Acqua all'1%, a cui, a seconda delle necessità o del tipo di test è stato aggiunto Acido Gibberellico (GA3 250 mg/l), un ormone in grado di rimuovere la dormienza. Per poter effettuare test statisticamente validi, di ogni campione testato sono state predisposte tre repliche con un numero variabile di 30 o 50 semi per replica (Baskin & Baskin 2014), a seconda della dimensione del seme e del campione. I semi così preparati sono stati incubati in incubatori a controllo di luce (impostata a 12 ore di luce e 12 di buio) e temperatura, considerando condizioni giornaliere di temperatura costante e/o alternata (in quest'ultimo caso, la temperatura più calda corrispondeva con il periodo in luce). Al fine di rimuovere eventuali fenomeni di dormienza nei semi sono stati testati periodi di vernalizzazione (stratificazione fredda), posizionando i semi su agar a 0°C al buio per 2 mesi.

La germinazione è stata verificata (*scoring*) settimanalmente per 4 settimane e i semi germinati tolti dalle capsule Petri ad ogni controllo. Al termine del test i semi non germinati sono stati tagliati con un bisturi (*cut test*) per verificare se fossero vivi, morti o vuoti e quindi stimare la vitalità percentuale del campione secondo la formula: (numero di semi vivi al termine del test / numero di semi seminati) \* 100. Poiché con ogni



probabilità i semi morti e vuoti lo erano anche all'inizio del test, ai fini della stima della percentuale di germinazione, questi sono stati scalati dal numero totale di semi seminati. Ad esempio se su 30 semi seminati 10 sono risultati vuoti o morti al termine del test, il numero di semi vivi effettivamente seminati è stato di 20. Pertanto la percentuale di germinazione è stata calcolata su di un totale di 20 semi vivi seminati secondo la formula: (numero di semi germinati / numero di semi vivi seminati) \* 100.

## 2.2 Informazioni disponibili

Il primo passo nell'identificazione dei requisiti di germinazione delle specie C3 è stata la verifica delle informazioni già note in letteratura e nei database delle banche semi della rete ENSCONET. In particolare è stato utilizzato il database SID (Seed Information Database; <http://data.kew.org/sid/>) reso disponibile online dalla Millennium Seed Bank dei Royal Botanic Gardens di Kew (UK).

Delle 48 specie C3, 34 erano già presenti nel suddetto database. Per queste specie i test di germinazione sono stati eseguiti inizialmente seguendo le condizioni riportate nel database che hanno restituito i migliori risultati in termini di germinazione percentuale (Tabella 3).

14 specie non sono presenti nel database SID. Per queste ci si è riferiti alle condizioni ottimali di altre specie dello stesso genere o all'esperienza precedentemente maturata presso il Laboratorio di conservazione delle risorse fitogenetiche dell'agroambiente (Resp. Dr. Andrea Mondoni).

Specie	Migliore germinazione ottenuta	Temperatura (°C)	Substrato	Fotoperiodo (h luce/h buio)	Stratificazione/Trattamenti
<i>Aegopodium podagraria</i>	60%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	imbibed on for 8 weeks at 6°C, then seed scarified
<i>Alliaria petiolata</i>	100%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	seed scarified (covering structure removed)
<i>Angelica sylvestris</i>	95%	25/10°C	Agar 1%	8/16	
<i>Arctium lappa</i>	100%	26°C	Agar 1%	12/12	
<i>Caltha palustris</i> L.	89%	23/9°C	Agar 1%	12/12	imbibed for 8 weeks at 6°C
<i>Carex hirta</i>	88%	33/19	Agar 1%	12/12	imbibed for 8 weeks at 6°C - imbibed for 4 weeks at 33/19°C - seed scarified
<i>Carex leporina</i>	88%	33/19	Agar 1%	12/12	imbibed for 8 weeks at 6°C - imbibed for 4 weeks at 33/19°C - seed scarified
<i>Carex otrubae</i>	41%	22/10°C	Filter paper	24/0	4°C, 24D, 6 months
<i>Carex pendula</i>	100%	35/20°C	Agar 1%	8/16	seed scarified
<i>Carex pseudocyperus</i>	100%	33/19	Agar 1%	12/12	
<i>Carex remota</i>	100%	22/8°C	Moist filter paper	24/24	4°C, 24D, 6 months
<i>Carex spicata</i>	88%	33/19°C	Agar 1%	12/12	
<i>Carex strigosa</i>	100%	33/19°C	Agar 1%	12/12	seed sterilised (immersed in 10% Domestos solution for 5 mins), then seed scarified

<i>Chaerophyllum temulum</i>	91%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	
<i>Circaea lutetiana</i>	85%	16°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	8/16	imbibed on 1% agar for 8 weeks at 5°C
<i>Digitalis lutea</i>	100%	20°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	8/16	imbibed on 1% agar for 4 weeks at 5°C
<i>Epilobium hirsutum</i>	100%	21°C	Agar 1%	12/12	
<i>Epilobium montanum</i>	92%	26	Agar 1%	12/12	
<i>Epilobium parviflorum</i>	100%	15°C	Agar 1%	8/16	
<i>Epilobium tetragonum</i>	100%	20°C	Agar 1%	8/16	
<i>Eupatorium cannabinum</i>	100%	23/9; 25/10; 35/20; 25/10	Agar 1%	8/16; 12/12	imbibed for 8 weeks at 6°C
<i>Filipendula ulmaria</i>	95%	20/10°C; 23/9°C	Agar 1%	8/16; 12/12	
<i>Hypericum tetrapterum</i>	100%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	
<i>Juncus articulatus</i>	95%	20°C	Agar 1%	12/12	emoisturised in high humidity over water for 1 day at 20°C, then imbibed on 1% agar for 8 weeks at 5°C
<i>Juncus conglomeratus</i>	100%	33/19	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	imbibed on 1% agar for 8 weeks at 6°C
<i>Juncus effusus</i>	97%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	imbibed for 8 weeks at 2°C
<i>Juncus inflexus</i>	95%	35/20°C	Agar 1%	8/16	
<i>Lunaria rediviva</i>	85%	26/16°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	seed scarified
<i>Myosotis scorpioides</i>	100%	11°C	Agar 1%	12/12	
<i>Pimpinella major</i>	89%	23/9°C	Agar 1%	12/12	
<i>Salvia glutinosa</i>	99%	21°C	Agar 1%	12/12	
<i>Saxifraga rotundifolia</i>	95%	25/8°C	Agar 1%	8/16	
<i>Silene dioica</i>	100%	16; 21; 26; 23/9; 26/11; 26/16	Agar 1%	12/12	
<i>Trollius europaeus</i>	100%	23/9°C	Agar 1% + 250 mg/l (GA3)	12/12	imbibed for 8 weeks at 26°C - imbibed for 8 weeks at 6°C

**TABELLA 3 – Informazioni sulle migliori condizioni di germinazione delle specie C3 disponibili nel Database SID della Millenium Seed Bank (Royal Botanic Garden, Kew).**

### 2.3 Risultati dei test di germinazione e protocolli di riproduzione

Di seguito vengono riportati e discussi i risultati dei test di germinazione effettuati sulle specie C3. Poiché in molti casi le problematiche legate alla germinazione dei semi sono comuni a ranghi tassonomici superiori alla specie, i risultati sono presentati raggruppati per famiglia. I risultati dei test di germinazione sono riportati in allegato 3.

### *Apiaceae*

Le Apiacee hanno mostrato un'ottima vitalità iniziale sempre superiore all'80%, indice di semi di buona qualità dei semi e dell'efficacia delle tecniche di pulizia dei campioni. Gli undici test effettuati su quattro specie di Apiaceae hanno mostrato come la germinazione sia promossa da temperature alternate nel range dei 25/15°C e 20/10°C. In alcuni casi (*Chaerophyllum temulum* e *Pimpinella major*) la stratificazione fredda ha ulteriormente incrementato la percentuale di germinazione finale. Nel caso di *P. ostrutium* l'utilizzo di GA3 ha promosso la germinazione fino ad avvicinarsi al 100%. Tuttavia anche senza l'uso di GA3, ma con stratificazione fredda la specie ha mostrato una germinazione superiore al 50%, buona nel caso di specie spontanee.

### *Asteraceae*

Le asteraceae hanno mostrato una qualità del campione generalmente scarsa, tipica della famiglia, in cui molti semi sono poco vitali per effetto dell'*inbreeding* (es. genere *Senecio*) e per la predazione da parte di invertebrati. Tuttavia, i semi vitali non presentano particolari esigenze di germinazione; infatti la germinazione finale ha superato l'80% in 3 delle 5 specie testate, sia a temperature fisse che alternate, ma sempre sopra i 20°C e senza stratificazione fredda. Tuttavia, per raggiungere tali valori in *Adenostyles australis* è stato necessario utilizzare GA3. A sé stante è la performance di *Senecio ovatus* ed *Arctium lappa*, la cui germinazione è stata decisamente bassa a tutte le condizioni testate. *Arctium lappa* è specie comune che non presenta solitamente problemi di germinazione, pertanto i risultati ottenuti potrebbero dipendere dalla non perfetta maturazione dei semi al momento della raccolta. Mentre per *Senecio ovatus* ulteriori approfondimenti saranno necessari per meglio definire i requisiti di germinazione.

### *Boraginaceae*

Unica specie trattata di questa famiglia è *Myosotis scorpioides* con una germinazione moderata del 56% a 20°C. Ulteriori test con GA3 o stratificazione fredda, sono necessari per valutare eventuali fenomeni di dormienza.

### *Brassicaceae*

La famiglia delle brassicaceae ha restituito risultati diversi a seconda della specie. *Arabis alpina* ha mostrato una pronta germinazione (oltre il 90%) a 20°C, mentre *Lunaria rediviva* ha mostrato una germinazione nulla e ulteriori approfondimenti sono in corso per questa specie.

### *Caryophyllaceae*

Unica specie testata nella famiglia è *Silene dioica*, che ha mostrato una germinazione elevata a diverse temperature, sia alternate sia fisse. Tuttavia, per questa specie ci si attendeva una germinazione prossima al 100%, non raggiunta nemmeno con l'uso di GA3, nonostante la vitalità iniziale molto alta. Non è da

escludere che le popolazioni del casentino abbiano requisiti di germinazione luogo-specifici, dovuti all'isolamento.

#### *Cyperaceae*

Le cyperaceae sono rappresentate da specie del genere *Carex*. I risultati dei test di germinazione sono contrastanti; infatti le specie testate possono chiaramente essere divise in due gruppi, uno con una germinazione molto elevata, prossima in molti casi al 100% e uno in cui la germinazione è stata molto bassa, anche nulla. Del primo gruppo fanno parte *C. leporina*, *C. pendula*, *C. spicata* e *C. strigosa* la cui migliore performance è stata ottenuta con temperature alternate elevate (30/20; 25/15), senza GA3 o stratificazione fredda. *C. riparia* ha mostrato pure una germinazione molto elevata a 20/10°C, ma con GA3. Il secondo gruppo comprende *C. hirta*, *C. otrubae* e *C. vesicaria* in cui la germinazione non ha mai raggiunto il 10% e che in *C. vesicaria* è stata nulla, anche con GA3 e con stratificazione fredda. Ad eccezione di *C. vesicaria*, la vitalità iniziale è stata decisamente bassa in queste specie. Ciò può essere dovuto a raccolta di semi non maturi o a problemi intrinseci della popolazione (isolamento, inbreeding).

#### *Juncaceae*

La famiglia Juncaceae è rappresentata da tre specie del genere *Juncus*, in cui la germinazione è stata elevata a temperature alternate elevate (30/20; 25/15) precedute da due mesi di stratificazione fredda.

#### *Lamiaceae e Liliaceae*

Sia *Salvia glutinosa* sia *Asphodelus macrocarpus* hanno mostrato una germinazione dei semi estremamente bassa nonostante la vitalità abbastanza elevata. Ulteriori test con GA3 o vernalizzazione sono necessari per diagnosticare eventuali fenomeni di dormienza.

#### *Onagraceae*

Tutte le specie del genere *Epilobium* ad eccezione di *E. montanum* hanno mostrato la miglior performance di germinazione a 20°C senza uso di GA3 o stratificazione fredda. Ulteriori indagini sono necessarie per verificare se la stratificazione fredda possa migliorare la germinazione in *E. montanum*.

#### *Ranunculaceae*

La famiglia Ranunculaceae spesso presenta germinazioni percentuali basse a causa dell'embrione poco sviluppato che necessita di post-maturazione una volta dispersi i semi. Nel caso specifico delle entità testate la germinazione è stata soddisfacente superando sempre il 50% e raggiungendo in due casi (*Caltha palustris* e *Trollius europaeus*) il 90%. In *Caltha palustris* la miglior performance si è avuta con temperatura alternata di 25/15 sia con che senza GA3.

## *Saxifragaceae e Scrophulariaceae*

Nella prima famiglia *Saxifraga rotundifolia* ha raggiunto il 100% di germinazione a temperature fisse di 15 e 20°C senza GA3 o stratificazione. *Digitalis lutea*, unica rappresentante delle Scrophulariaceae ha raggiunto una germinazione prossima al 100% a 20°C preceduta da due mesi di stratificazione fredda.

### **3. CONCLUSIONI**

L'attività svolta nell'ambito dell'azione C3 "Produzione del materiale vegetativo per la ripristino vegetazionale del habitat 6430" prevedeva la conservazione in banca del germoplasma di semi delle specie ritenute utili alla ricostruzione di habitat o di particolare interesse conservazionistico. Lo stoccaggio definitivo delle accessioni raccolte nel corso del 2016 avverrà una volta concluse le operazioni di produzione del materiale vegetale per il ripristino degli habitat nei siti di intervento. Inoltre, è prevista la riproduzione di non meno di 15 specie (e 10.000 individui) tipiche degli habitat umidi del Parco, soglia ampiamente superata dalla messa in produzione di 48 specie per un totale di circa 15.000 individui alla data della presente relazione. Tali valori non comprendono le specie strettamente acquatiche che verranno traslocate a partire da propaguli raccolti direttamente dai siti di origine e immessi nei siti di ripristino.

Per 38 delle specie elencate in tabella 1, sono stati definiti i protocolli di germinazione, mentre per le restanti specie la riproduzione avviene per via vegetativa da propaguli raccolti in campo. In linea generale si può affermare che l'azione C3 abbia contribuito a definire i requisiti di germinazione di 14 specie non presenti nei database internazionali e a raffinare le conoscenze su altre 24 specie; tali conoscenze saranno utili ai fini della riproduzione di specie di interesse per il ripristino di habitat umidi montani.

### **BIBLIOGRAFIA**

- Baskin C.C., Baskin J.M. (2014) Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 2nd ed, Academic Press, London.
- ENSCONET (2009) ENSCONET Seed Collecting Manual for Wild Species. Royal Botanic Gardens, Kew (UK) & Universidad Politécnica de Madrid (Spain).
- FAO/IPGRI, 1994. Genebank Standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- ISTA (2013) International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf.
- Maschinski J., Haskins K.E. (2012) Plant reintroduction in a changing climate, promises and perils. Island press, Washington, DC.
- Rossi G., Amosso C., Orsenigo S., Abeli T. (2013) Linee guida per la traslocazione di specie vegetali spontanee. MATTM-Ist. Sup. Protezione e Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma.

Dr. Thomas Abeli  
(Responsabile scientifico)

Prof. Graziano Rossi  
(Esperto di seed banking)

Dr. Andrea Mondoni  
(Esperto di seed banking)