



APAT

Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici



Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma

Informazioni legali

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

© APAT, Dipartimento Difesa della Natura Servizio Parchi e risorse naturali
Manuali e Linee Guida 37/2006

ISBN 88-448-0179-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Apat e Centro Conservazione Biodiversità (Univ. Cagliari)

Coordinamento tipografico e distribuzione
Olimpia Girolamo
APAT - Servizio Stampa ed Editoria
Ufficio Pubblicazioni

Impaginazione e stampa
I.G.E.R. srl - Viale C. T. Odiscalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare settembre 2006

Edito da

Gianluigi Bacchetta, Giuseppe Fenu, Efisio Mattana, Beti Piotto e Myriam Virevaire
con la collaborazione dei partecipanti al Progetto Interreg IIIB Genmedoc

Autori

Gianluigi Bacchetta¹, Piero Belletti², Salvatore Brullo³, Luisa Cagelli⁴, Valentina Carasso⁵, Josè Luis Casas⁶, Claudio Cervelli⁷, M. Carmen Escribà⁸, Giuseppe Fenu¹, Fabio Gorian⁹, Jaime Güemes¹⁰, Efisio Mattana¹, Massimo Nepi¹¹, Ettore Pacini¹¹, Pietro Pavone³, Beti Piotto¹², Cristiano Pontecorvo¹, Aranxta Prada⁸, Gianfranco Venora¹³, Lorenzo Vietto¹⁴, Myriam Virevaire¹⁵

Ringraziamenti

Amparo Alonso Chicano, Rosanna Augello, Edoardo Biondi, Carlo Blasi, François Boillot, Alvaro Bueno Sanchez, Monica Casanovas, Massimo Cason, Donato Chiatante, Rosaria Congiu, Roberto Crosti, Pep Luis Gradaille, Anna Guglielmo, Raquel Herreros, Borja Jimenez Alfaro, Simon Linnington, Antoni Marzo, Nuria Membrives, Marian Morcillo Benlloch, Paolo Mulè, Carlo Murgia, Pietro Perrino, Francesco Maria Raimondo, Marco Rossetto, Cristina Salmeri, Mathilde Steffann, Costas Thanos, Pilar Ventimilla.

¹ Centro Conservazione Biodiversità (CCB) – Dipartimento di Scienze Botaniche, Università degli Studi di Cagliari, v.le Sant'Ignazio da Laconi, 13 – 09123 Cagliari (Italia)

² DIVAPRA Genetica Agraria, Università degli Studi di Torino, via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco, Torino (Italia)

³ Dipartimento di Botanica, Università degli Studi di Catania, via A. Longo, 25 – 95123 Catania (Italia)

⁴ Regione Lombardia, Direzione Generale Agricoltura, Unità Organizzativa Sviluppo e Tutela del Territorio Rurale e Montano, via Pola, 12/14 - 20124 Milano (Italia)

⁵ Via Madonna dei boschi, 88 - 12016 Peveragno, Cuneo (Italia)

⁶ Unidad de Biotecnología Vegetal, Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad), Universidad de Alicante, Carretera de San Vicente del Raspeig s/n - E-03690 San Vicente del Raspeig, Alicante (España)

⁷ CRA – Istituto Sperimentale per la Floricoltura, corso Inglesi, 508 - 18038 Sanremo, Imperia (Italia)

⁸ CIEF – Banc de Llavors Forestals, Conselleria de Territori i Habitatge, Generalitat Valenciana, Avda. Comarques del País Valencià, 114 - 46930 Quart de Poblet (España)

⁹ Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale, Corpo Forestale dello Stato, via del Ponte, 256 – 37020 Peri (Italia)

¹⁰ Jardín Botánico, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, C/ Quart, 80 – 46008 Valencia (España)

¹¹ Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Biologia Vegetale, Laboratorio di Ecofisiologia della Riproduzione, Università degli Studi di Siena, via Pier Andrea Mattioli, 4 – 53100 Siena (Italia)

¹² Dipartimento Difesa della Natura dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (APAT), Sezione Parchi e Risorse Naturali, via Curtatone, 3 – 00185 Roma (Italia)

¹³ Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, via Rossini, 1 – 95041 Caltagirone (Italia)

¹⁴ CRA – Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, strada Frassineto, 35 - 15033 Casale Monferrato, Alessandria (Italia)

¹⁵ Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, Le Castel Sainte Claire, rue Sainte Claire – 83418 Hyères (France)

PATROCINATORI



Association Internationale Forêts Méditerranéennes



Centro di Ricerca Interuniversitario "Biodiversità, Fitosociologia ed Ecologia del Paesaggio", Università La Sapienza Roma



Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (Instituto Universitario de Investigación), Universidad de Alicante



Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale,
Corpo Forestale dello Stato, Peri (Verona)



Centro per la Salvaguardia e la Valorizzazione della Biodiversità vegetale della Sicilia centro-orientale (CEVASABI)



Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles



CRA – Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, Casale Monferrato (Alessandria)



CRA – Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo (Imperia)



Dipartimento di Botanica, Università degli Studi di Catania



Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Biologia Vegetale,
Laboratorio di Ecofisiologia della Riproduzione, Università di Siena



Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo



DIVAPRA Genetica Agraria, Università di Torino



Generalitat Valenciana, Conselleria de Territori i Habitatge, Centre d'Investigació i Experiències Forestals (CIEF),
Banc de Llavors Forestals



Jardí Botànic, Universitat de València



Jardín Botánico Atlántico
Jardín Botánico Atlántico de Gijón



Orto Botanico, Università Politecnica delle Marche



Progetto Interreg IIIB "Genmedoc"



Provincia di Cagliari



Società Botanica Italiana



Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia

PRESENTAZIONE

Nel 2001 i Governi dell'Unione Europea si sono impegnati a raggiungere un obiettivo ambizioso: arrestare la perdita di biodiversità in Europa entro il 2010. Questo traguardo figura nella strategia dell'UE per lo sviluppo sostenibile nonché nel Sesto Programma d'azione per l'ambiente (2002-2012) e nel corso della riunione del 9 marzo 2006 del Consiglio Europeo l'impegno è stato ribadito con forza. Il panorama è desolatamente semplice: le risorse biologiche sono fondamentali per la nostra sopravvivenza e la loro perdita mette a repentaglio non solo l'esistenza di singole specie, habitat e interi ecosistemi, ma la presenza dell'uomo sulla terra. Attualmente la perdita di diversità biologica procede con un ritmo variabile da caso a caso, ma compreso tra 50 e 1.000 volte quello naturale.

La conservazione fuori dall'ambiente naturale (*ex situ*) del germoplasma, ovvero del materiale in grado di trasmettere i caratteri ereditari, permette di preservare in modo diretto la diversità a li vello genetico e di specie, mentre indirettamente contribuisce alla diversità degli ecosistemi. Il termine germoplasma è spesso riferito ai semi ma oggi, grazie a tecniche efficaci, è abbastanza frequente conservare anche altre forme capaci di propagare l'ereditarietà come tessuti, polline, talee e spore.

Per le piante coltivate la conservazione *ex situ* si pratica senza sosta su basi scientifiche da quasi un secolo, anche nell'ambito di reti organizzate a livello globale. In questi giorni, ad esempio, il Governo norvegese sta per avviare la costruzione della più grande banca mondiale del seme delle piante agricole, contenete il risultato di 10.000 anni di agricoltura. La necessità di conservare piante per uso alimentare ed industriale è stata vissuta come priorità nei confronti delle specie non addomesticate, ma queste, oggi è chiaro, sono altrettanto importanti per garantire i servizi derivanti dal buon funzionamento degli ecosistemi che si traducono in benessere per tutti i viventi. Da quanto appena detto si capisce perché nel mondo siano nate con ritardo le banche del germoplasma delle piante spontanee. In Italia è stata recentemente costituita la RIBES – Rete italiana delle banche del germoplasma per la conservazione *ex situ* della flora spontanea, formata da una ventina di istituzioni pubbliche, private e no profit, e collegata attivamente ad analoghe reti europee.

Il compito di preservare *ex situ*, nel modo migliore, tutte le risorse genetiche di cui abbiamo e avremo bisogno non ha niente di passivo: non si tratta di allineare al freddo semi chiusi in bottigliette ma di capire e seguire l'intero ciclo del materiale custodito, dall'inizio alla fine. E rispondono proprio a questo scopo i contenuti del presente manuale che vuole descrivere ciò che si conosce sulla raccolta, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma delle unità tassonomiche della flora autoctona dei territori mediterranei.

Certamente consapevoli che il lavoro è tutt'altro che finito, siamo pronti a raccogliere indicazioni e suggerimenti ed a mantenere un costante aggiornamento

Giorgio Cesari
Direttore Generale dell'APAT

PRESENTAZIONE

L'APAT svolge istituzionalmente attività tecnico-scientifiche di interesse nazionale per la protezione dell'ambiente e più nello specifico delle risorse naturali, così come risulta dagli obiettivi delineati nel piano triennale delle attività del Dipartimento Difesa della Natura.

Negli ultimi anni, in virtù di tale compito istituzionale, sono stati realizzati diversi volumi che hanno posto l'attenzione sulla difesa della biodiversità vegetale e in particolare sulla conservazione *ex situ* della stessa. Proprio seguendo questo filone, l'APAT ha deciso di realizzare un manuale che fosse utile a quanti operano nello specifico settore della conservazione e gestione del germoplasma. Per fare ciò il Dipartimento Difesa della Natura ha deciso di avvalersi della collaborazione del Centro Conservazione Biodiversità (CCB) dell'Università degli Studi di Cagliari, realizzando un volume che affronta queste tematiche in maniera organica e cercando di utilizzare un linguaggio di facile comprensione, pur mantenendosi su un livello di rigorosità scientifica elevato. Il tutto tenendo in debita considerazione i temi trattati e l'alta specializzazione ormai raggiunta per quanto concerne la conservazione del germoplasma.

L'obiettivo prioritario è stato quello di riunire specifiche professionalità (21 autori di 15 istituzioni) presenti in diversi paesi comunitari (Italia, Spagna e Francia), con lo scopo di realizzare uno strumento utile a quanti operano sia in ambito istituzionale sia in campo accademico, nonché in settori di carattere tecnico come le banche del germoplasma o produttivo quale il floro-vivaismo.

Il volume è così il frutto non solo dell'esperienza maturata dagli autori negli specifici settori di competenza, ma comprende anche il lavoro di campo ed i risultati ottenuti attraverso il progetto Interreg III B Genmedoc, che ha portato alla realizzazione di un network mediterraneo di banche del germoplasma. Va infatti rilevato come, per quanto la flora di tali territori sia ben conosciuta e ormai si contano numerose pubblicazioni di carattere scientifico che affrontano queste tematiche, non esiste ad oggi un manuale di lavoro e un software ad esso collegato in grado di garantire una efficacia nelle azioni di conservazione *ex situ* attuate dalle numerose banche presenti nel Mediterraneo ed in particolare nel nostro paese. La pubblicazione realizzata mira a colmare tale deficit e si pone come punto di partenza per poter, in futuro, riuscire ad operare in maniera più coordinata seguendo criteri etici, normativi e metodologici che possano condurre ad una reale ed efficace conservazione della biodiversità *ex situ*.

Tutto questo con il fine ultimo di contribuire fattivamente a quanto stabilito nella Convenzione sulla Diversità Biologica e recepito dall'Italia, ma anche a quanto previsto dalla Strategia Globale di Conservazione delle Piante e dalla Strategia Europea per la Conservazione delle Piante.

Marisa Amadei

Direttore del Dipartimento Difesa della Natura dell'APAT

PRESENTAZIONE

Il mio commento dopo la lettura di questo manuale parte necessariamente da un ricordo personale. Da giovane ricercatore di uno dei laboratori più attivi in Italia nello studio della biologia del seme fui invitato nell'allora Repubblica Cecoslovacca a tenere una serie di seminari in alcuni centri di ricerca dell'Accademia delle Scienze di quella nazione. La mia ricerca era legata allo studio dei fattori che controllano la dormienza dei semi e per questo motivo in quella occasione ebbi l'opportunità di visitare per la prima volta una banca del germoplasma. Mi resi immediatamente conto del grande interesse che quei colleghi ponevano in quella struttura di ricerca e quale attenzione avessero per la raccolta, catalogazione e conservazione del patrimonio genico vegetale della loro nazione. Dai loro discorsi emergeva chiaramente la finalità di scongiurare la possibile perdita di biodiversità specialmente in piante di grande interesse agronomico. Il contrasto tra l'organizzazione di quella struttura di ricerca e quella mia di provenienza era netto. Infatti, nel caso della banca del germoplasma dominava una semplicità di organizzazione ed una quasi totale assenza di strumentazioni costosissime ad alto contenuto tecnologico. Questo concetto di ricerca contrastava palesemente con il mio che era allora fondato sull'illusione che la ricerca d'avanguardia si può fare solo quando si possiede l'ultimo modello di una certa apparecchiatura scientifica. A trent'anni di distanza i mass-media dei paesi più industrializzati sottolineano costantemente la perdita di biodiversità in atto e sottolineano l'esigenza di attuare misure di difesa e conservazione. Allora devo riconoscere con amara ironia che, anche senza apparecchiature costose, quei colleghi già allora erano inseriti in una linea di ricerca di grandissima attualità ed importanza. Inoltre, anche senza il ricorso ai primi computer che cominciavano ad arredare i laboratori di ricerca in occidente, avevo notato come quella struttura di ricerca curasse molto il proprio inserimento in una rete fittissima ed efficiente di collegamenti tra tutte le banche del germoplasma dell'Europa orientale.

Oggigiorno assistiamo, in una Europa dai confini grandemente allargati, ad una costante nascita di nuove banche del germoplasma: ognuna rispondente a proprie caratteristiche di peculiarità e spesso fortemente legata al territorio. Ovviamente ogni nuova struttura si dota delle tecnologie più moderne a disposizione al momento stesso della propria istituzione e questo ha introdotto una grande differenziazione che si riscontra anche nelle stesse attività di gestione di ogni singola struttura. Questa impostazione differenziata delle banche del germoplasma porta al bisogno naturale di riunirle in una rete con lo scopo di garantirne l'interazione e l'integrazione determinando un aumento dell'efficienza complessiva e la possibilità ad ognuna di assolvere a finalità istituzionali non solo locali ma anche nazionali. Allo stesso tempo, in un mondo teso sempre più alla globalizzazione di tutti i processi, esiste anche l'esigenza di cercare un raccordo di queste iniziative nazionali con quelle del livello planetario. Il raggiungimento di questo obiettivo finale è reso facile dall'evoluzione dell'informatica e sarà l'unico in grado di garantire realmente la conservazione della biodiversità in tutti i suoi aspetti. Questo manuale giunge quindi in un momento particolarmente favorevole e si pone come un necessario strumento di lavoro per tutti coloro che sono coinvolti nella gestione delle banche del germoplasma. Esso rappresenta una chiara sintesi di quelle che sono le finalità stesse di queste strutture di ricerca ed esamina in modo esauriente le attività che si svolgono in connessione alla finalità di conservazione sia *in situ* che *ex situ*. L'impostazione è lineare e quindi potrà svolgere, oltre che un ruolo di guida pratica, anche un ruolo di divulgazione per chiarire al grande pubblico i fondamentali essenziali della protezione e conservazione della biodiversità.

In conclusione devo dire, a nome della Società Botanica Italiana e mio personale, di essere grato a tutti coloro che hanno in qualche modo contribuito alla realizzazione di questo manuale. Allo stesso

tempo auspico che esso possa superare al più presto i confini limitati del mondo della ricerca scientifica per contribuire a far crescere in tutti i cittadini, ed in particolare nei gestori della vita pubblica, il livello di consapevolezza della necessità di garantire a queste strutture quanto occorre per essere potenziate e messe in grado di svolgere al meglio la loro indispensabile attività di ricerca.

Donato Chiatante
Presidente della Società Botanica Italiana

PRESENTAZIONE

L'esistenza secondo le regole della Natura è stata vissuta, sicuramente in modo inconsapevole, da quei popoli che senza alcun distacco dal proprio habitat, crescevano o decrescevano in base alle naturali disponibilità, senza forzature verso l'ambiente, in totale connessione con la saggezza omeostatica della terra. In un ciclo armonico in cui armonia non allude all'estetica ma all'equilibrio, alla sostenibilità.

L'uomo è poi passato, talvolta con azioni velocissime, ad un impiego eccessivo delle risorse, a uno sfruttamento smisurato. Ci bastano due soli esempi: la trasformazione del territorio iniziata col disboscamento operato dall'Impero Romano ed l'attuale consumo pro capite degli Europei (il triplo di quanto il pianeta può fornire ad ogni abitante). Non si fa un'apologia della vita dell'uomo primitivo, sarebbe impensabile, ma è bene ricordare che oggi gli habitat naturali originari, capaci di generare e custodire diversità, sono assediati dall'urbanizzazione, dall'industria, da piante ed animali alloctoni, dai cambiamenti climatici. Anche se gestiti nei migliore dei modi non sempre bastano, da soli, ad avere cura dei nostri tesori. La storia umana, tuttavia, è la continua ricerca di equilibri.

Ecco, quindi, che davanti a limitazioni, se non impossibilità, di gestire le risorse in situ si ha bisogno di banche del germoplasma ovvero di luoghi deputati a proteggere con cura il materiale necessario a perpetuare la diversità della vita. Non a caso si parla di 'banche del seme', 'banche di spore', 'banche di tessuti'; banche in quanto spazi capaci di custodire per lunghi anni queste materie preziose e banche perchè istituzioni abili nel fare fruttare nel modo più vantaggioso il capitale depositato. Non è perciò una conservazione passiva: nelle banche del germoplasma si studiano molti aspetti biologici perché, ad esempio, a niente servirebbe avere una collezione di seme di specie rare se poi non si sa come propagarle.

Il presente Manuale, che APAT ha preparato con la collaborazione di numerosi ricercatori spagnoli, francesi ed italiani, vuole essere una guida alle operazioni di raccolta, pulizia, lavorazione, conservazione, analisi qualitativo e propagazione del germoplasma delle piante spontanee nelle aree mediterranee. Il lavoro non è certo finito ma crediamo possa diventare un punto di riferimento per chi svolge attività in questo campo.

Paolo Gasparri

Responsabile della Sezione Parchi e Risorse Naturali dell'APAT

PREMESSA

L'oggetto del manuale è costituito dal germoplasma delle unità tassonomiche relative alla flora autoctona dei territori mediterranei e, più in generale, europei. Tale testo è stato predisposto per operare sul terreno e in laboratorio seguendo semplici e chiare indicazioni nell'ottica di una conservazione *in situ* ed *ex situ* rigorosa, rispettosa della biodiversità, del territorio e della cultura che ne deriva. Si ritiene che le metodologie di seguito espresse possano agevolare il lavoro dei raccoglitori e quello dei curatori delle banche, garantendo la raccolta, il trattamento e la migliore gestione possibile del germoplasma, nel rispetto delle procedure e degli standard nazionali e internazionali.

Questo lavoro è rivolto sia a quanti operano in settori specifici (tecnici delle banche del germoplasma, vivaisti, addetti ai lavori in ambito istituzionale, ricercatori e docenti universitari) sia a tutte le persone interessate alle tematiche della conservazione *ex situ*. Particolare attenzione è stata rivolta agli studenti, ai quali si è cercato di trasferire con linguaggio semplice le esperienze di ricerca e sperimentazione svolte dagli Autori e tutte le informazioni ricavate dalla letteratura scientifica disponibile, con l'obiettivo di fornire loro indispensabili elementi conoscitivi di base.

E' bene ricordare che la difesa della biodiversità attraverso la conservazione delle risorse genetiche non è sempre rivolta a endemismi o a specie d'interesse fitogeografico, ma contempla anche piante di larga diffusione in Europa, talvolta potenzialmente minacciate dal progressivo restringersi del loro areale di distribuzione. Si pensi a quanto è successo alle formazioni boschive della Pianura Padana che oggi, fortemente frammentate dall'espansione agricola, occupano una superficie equivalente a meno dell'1% rispetto a quella originale (Gorian, *in verbis*).

Il manuale è strutturato in 14 capitoli che descrivono le metodologie attualmente più utilizzate dal momento della raccolta in campo del germoplasma fino alla sua conservazione. Le azioni che riguardano il germoplasma da conservare sono spesso dimensionate a quantitativi modesti di materiale; ciò non esclude che in molti casi raccolta, lavorazione e conservazione siano rivolte a volumi consistenti ed operate meccanicamente.

Al testo vengono allegate le schede di lavoro, sia di campo sia di laboratorio e vivaio, che permettono la gestione ed il monitoraggio dei lotti di semi durante tutto il processo di conservazione; tali schede consentono inoltre di archiviare i dati in un software specifico attualmente in fase di revisione finale. E' stato infine elaborato un glossario di termini tecnici e nomenclaturali che sarà di fondamentale aiuto per la comprensione dei testi. Per la nomenclatura sistematica si è fatto riferimento al recente lavoro di Conti *et al.* (2005) realizzato su incarico della Direzione per la Protezione della Natura del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio.

Il presente lavoro non può e non vuole essere una guida definitiva, ma uno strumento dinamico in costante evoluzione che possa servire da riferimento etico e metodologico comune. Si lascia perciò aperta la possibilità di gradite integrazioni da parte di chiunque voglia contribuire a migliorare la qualità di questa guida. Divulgazione e aggiornamenti saranno possibili attraverso la presenza del testo in rete, nel sito www.apat.it, e sono inoltre previste versioni in altre lingue.

Gli Autori

INDICE

PATROCINATORI	4
PRESENTAZIONE	7
PRESENTAZIONE	9
PRESENTAZIONE	11
PRESENTAZIONE	13
PREMESSA	15
1. INTRODUZIONE	23
1.1 Etica e filosofia della conservazione <i>ex situ</i> e <i>in situ</i>	24
1.2 Informazione e partecipazione	25
2. QUADRO NORMATIVO	
E CONVENZIONI SULLA TUTELA DELLA BIODIVERSITA'	27
2.1 Normative e convenzioni internazionali	27
2.1.1 Convenzione di Washington – CITES	27
2.1.2 Convenzione di Berna	28
2.1.3 Prima Conferenza Interministeriale per la Protezione dei Boschi in Europa	28
2.1.4 Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD)	28
2.1.5 Direttiva 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali, della flora e della fauna selvatica	29
2.1.6 Direttiva 1999/105/CE relativa alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione	29
2.2 Normativa e provvedimenti nazionali collegati	30
2.2.1 DM 22 dicembre 1992 “Metodi ufficiali di analisi per le sementi”	30
2.2.2 Proposta di Piano Nazionale sulla Biodiversità	31
2.3 Normativa ed Autorizzazioni Regionali	31
2.4 Strumenti di tutela e strategie adottate in campo internazionale	32
2.4.1 Liste Rosse e Blu del “International Union for Conservation of Nature (IUCN)”	32
2.4.2 Global Strategy for Plant Conservation (GSPC)	32
2.4.3 European Strategy for Plant Conservation (ESPC)	33
2.4.4 Global 200	33
2.5 Accesso alle risorse genetiche	33
3. RETI DI BANCHE DEL GERMOPLASMA	35
3.1 Reti nazionali	35
3.1.1 Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione <i>Ex Situ</i> della flora spontanea italiana (RIBES)	35

3.1.2 Red Española de Bancos de Germoplasmas de Plantas Silvestres (REDBAG)	36
3.1.3 Istituenda rete delle Banche del germoplasma forestale spagnole	37
3.1.4 Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN).....	37
3.2 Reti europee	39
3.2.1 GENMEDOC	39
3.2.2 ENSCONET	41
4. RACCOLTA DEL GERMOPLASMA	43
4.1 Criteri di scelta delle stazioni	43
4.2 Metodi di campionamento.....	44
4.2.1 Campionamento genetico	44
<i>Raccolta di semi di alberi e arbusti: considerazioni</i>	
<i>sul mantenimento della variabilità genetica</i>	<i>44</i>
4.2.2 Scelta degli individui da campionare	46
4.2.3 Numero e tipo di materiale vegetale per pianta	46
4.2.4 Considerazioni da tenere presenti durante la raccolta	47
4.3 Raccolta in campo del germoplasma	49
4.3.1 Individuazione del momento ideale per la raccolta	49
4.3.2 Prova del taglio.....	50
4.3.3 Protocollo di raccolta	51
4.3.4 Procedura tipo per la raccolta dei semi.....	51
4.4 Raccolta di dati e informazioni in campo: compilazione delle schede	52
4.4.1 Equipaggiamento per la raccolta del germoplasma e dei dati	52
4.5 Procedure da seguire in casi particolari	53
4.5.1 Mancata raccolta del germoplasma	53
4.5.2 Popolazioni di dimensioni estremamente ridotte	54
4.5.3 Danni biotici al popolamento	54
4.5.4 Condizioni meteorologiche sfavorevoli	54
4.5.5. Necessità di raccogliere campioni d'erbario e/o piante in vivo	55
4.5.6 Raccolta di campioni di suolo.....	55
4.6 Raccolta del polline.....	56
4.6.1 Introduzione	56
4.6.2 Categorie di granuli di polline	56
4.6.3 Perché si raccoglie il polline	57
4.6.4 Controllo della vitalità.....	58
4.6.5 Metodi di raccolta.....	59
5. TRASFERIMENTO DEL GERMOPLASMA	61
5.1 Conservazione temporanea del germoplasma	61
5.1.1 Conservazione delle accessioni di semi raccolte in campo	61
5.1.2 Estrazione dei semi dai frutti	61
5.2 Consegna alla banca	62
5.2.1 Accettazione delle accessioni.....	62
5.2.2 Documentazione da allegare all'accessione.....	62
5.2.3 Stato fitosanitario del materiale raccolto	62

5.2.4 Modalità di spedizione delle accessioni	63
5.2.5 Gestione delle accessioni provenienti da altri centri	64
5.2.6 Gestione del materiale da parte della banca	64
6. TRATTAMENTO DEL GERMOPLASMA PRIMA DELLA CONSERVAZIONE	65
6.1 Ingresso del germoplasma nella banca	65
6.2 Quarantena	66
6.3 Test iniziali finalizzati alla valutazione dei lotti in entrata	67
6.4 Frutti carnosi	67
6.5 Postmaturazione	67
6.6 Pulizia e lavorazione	68
6.6.1 Estrazione manuale	68
6.6.2 Estrazione a freddo	69
6.6.3 Estrazione a caldo	69
6.6.4 Operazioni meccaniche con attrezzatura da laboratorio	70
6.6.5 Operazioni manuali o miste	71
6.7 Quantificazione dell'accessione e analisi del germoplasma	71
6.8 Test qualitativi	72
6.8.1 Capacità germinativa	73
6.8.2 Vitalità	73
Prova del tetrazolio	73
Indigo-carmin	74
Soluzione di Lugol	74
Prova di conducibilità	74
Prova con diacetato di fluoresceina	74
Analisi radiografica	74
Risonanza magnetica	74
6.8.3 Prove di vigore	75
6.9 Deidratazione	75
6.9.1 Tolleranza alla deidratazione e categorie di conservazione	75
6.9.2 Camera di deidratazione	77
6.9.3 Dessiccanti artificiali	79
7. IMBALLAGGIO E CONSERVAZIONE	81
7.1 Conservazione a lungo termine	83
7.1.1 Congelazione	83
7.1.2 Liofilizzazione o ultradeidratazione	85
7.1.3 Crioconservazione in azoto liquido	86
Basi teoriche della crioconservazione	86
La crioconservazione in pratica	88
Applicazione della crioconservazione al germoplasma	89
7.2 Collezioni attive	89
7.2.1 Semina	89
Tipologie di semenzai	90
Contenitori per l'allevamento	91

<i>Substrati</i>	92
<i>Semina e pratiche colturali</i>	92
7.2.2 <i>Index Seminum</i>	94
7.2.3 <i>Duplicazione delle collezioni</i>	94
7.3 Metodi di conservazione del polline	95
7.4 Conservazione del materiale vegetativo	96
8. GERMINAZIONE	99
8.1 Definizione di germinazione	99
8.2 Fattori ambientali e germinazione	99
8.2.1 <i>Acqua</i>	100
8.2.2 <i>Temperatura</i>	100
8.2.3 <i>Ossigeno</i>	100
8.2.4 <i>Luce</i>	100
<i>Prova sperimentale per determinare la sensibilità alla luce</i>	101
8.3 Ostacoli alla germinazione: le dormienze	102
8.3.1 <i>Metodo pratico per determinare il tipo di dormienza</i> <i>su semi non sottoposti a deidratazione</i>	103
8.4 Eliminazione delle dormienze (pretrattamenti)	106
8.4.1 <i>Stratificazione fredda, vernalizzazione o prechilling</i>	107
8.4.2 <i>Stratificazione calda, estivazione, preheating o warming</i>	107
8.4.3 <i>Affumicazione</i>	108
8.4.4 <i>Scarificazione</i>	109
8.4.5 <i>Rimozione dei tegumenti</i>	109
8.4.6 <i>Rimozione delle sostanze inibitrici della germinazione</i>	109
8.5 Consigli pratici	109
8.5.1 <i>Acqua</i>	110
8.5.2 <i>Ossigeno</i>	110
8.5.3 <i>Temperatura</i>	111
8.5.4 <i>Luce</i>	111
8.5.5 <i>Ormoni ed altri prodotti</i>	111
<i>Gibberelline</i>	111
<i>Impiego di altri prodotti</i>	111
8.6 Determinazione ed elaborazione del o dei protocolli	111
8.7 Analisi dei risultati	114
8.7.1 <i>Categorie di valutazione</i>	114
8.7.2 <i>Percentuale di germinazione</i>	115
8.7.3 <i>Velocità di germinazione ('T50')</i>	115
8.7.4 <i>Ritardo di germinazione</i>	116
8.7.5 <i>Curve di interpretazione</i>	116
<i>Percentuale di germinazione in rapporto al tempo</i>	116
<i>Percentuale di germinazione in rapporto ai differenti protocolli</i>	117

9. GESTIONE DEL GERMOPLASMA	119
9.1 Gestione dei dati e dei campioni	119
9.2 Gestione del materiale vegetativo	121
10. APPROFONDIMENTI.....	123
10.1 Indicazioni per la raccolta, conservazione e semina dei semi di alberi e arbusti spontanei	123
10.1.1 Introduzione	123
10.1.2 Note per la consultazione della tabella 4	124
10.2 Come individuare le esigenze ecofisiologiche della germinazione?	137
10.2.1 Interpretazione dei risultati	139
10.3 Raccolta, conservazione e gestione del germoplasma delle <i>Salicaceae</i>	140
10.3.1 Propagazione agamica	141
10.3.2 Propagazione gamica	143
10.3.3 Raccolta e conservazione semi	144
10.3.4 Raccolta e conservazione polline	146
10.4 Un esempio di studio demografico: il progetto AFA in Spagna	147
10.4.1 Studio degli individui	148
10.4.2 Dati da raccogliere in ogni parcella	149
10.4.3 Produzione di frutti per pianta	150
10.4.4 Altri dati	150
10.4.5 Altri studi da condurre	150
10.5 Analisi d'immagine: uno strumento utile per la caratterizzazione dei parametri morfometrici e colorimetrici delle accessioni.....	151
10.6 Dispersione delle diaspore: influenza del vettore e della forma	154
10.6.1 Anemocoria.....	154
10.6.2 Idrocoria	154
10.6.3 Autocoria	155
10.6.4 Zoocoria.....	155
10.6.5 Elaiosomi e dispersione dei semi nelle piante mediterranee	155
Dispersione	155
Funzioni dell'elaiosoma	156
Elaiosomi e diplocoria	157
10.7 Banca dei semi del suolo	157
11. GLOSSARIO	160
12. INDIRIZZI UTILI	196
12.1 Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana (RIBES).....	196
12.2 Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN).....	198
12.3 Red Española de Bancos de Germoplasma de Plantas Silvestres (Red Bag)	199
12.4 Banche del Germoplasma e Centri per la conservazione internazionali	200
12.5 Siti web	201
12.6 Riviste scientifiche specializzate	205

13. SCHEDE ALLEGATE	208
13.1 Raccolta del germoplasma	209
13.2 Rilievo fenologico	210
13.3 Rilievo demografico	211
13.4 Rilievo floristico-sociologico	212
13.5 Studio della fauna associata	213
13.6 Studio meteo-climatico	214
13.7 Rilievo pedologico	215
13.8 Test iniziali	216
13.9 Pulizia e conservazione del germoplasma	217
13.10 Monitoraggio della deidratazione	218
13.11 Test di germinazione	219
13.12 Test colorimetrico	222
13.13 Gestione del materiale vegetativo	223
13.14 Gestione della semina	224
 14. BIBLIOGRAFIA	 226
 INDICE ANALITICO	 238

1. INTRODUZIONE

In una definizione semplificata il germoplasma viene considerato come il materiale in grado di trasmettere i caratteri ereditari da una generazione all'altra (Witt, 1985). Entrando più nel dettaglio, si può affermare che rappresenta la base fisica dell'eredità, ovvero la somma dei geni nonché dei fattori citoplasmici che governano l'ereditabilità.

Quando si parla di germoplasma, quindi, si deve pensare alle spore, al polline, ai tessuti o parti di piante, a singole cellule, al DNA ed al RNA ma, soprattutto, ai semi che rappresentano l'organo più impiegato dalle piante superiori per perpetuarsi ed il materiale più largamente conservato.

Il termine "germoplasma" è composto dai lemmi "germe", inteso come principio, origine e "plasma", che significa materia capace di generare altra materia vivente uguale o simile a quella di partenza (Perrino *et* Terzi, 2003). In breve, la parola "germoplasma" indica qualsiasi forma di vita e può essere riferita, in virtù dei diversi ranghi tassonomici, ad un genere (es.: germoplasma di *Olea*) oppure a una unità tassonomica specifica (es.: germoplasma di *Olea europaea* L.) o di rango varietale (es.: *O. europaea* L. var. *sylvestris* Brot.).

L'espressione "risorse genetiche" sostituisce spesso il concetto di "germoplasma" quando ci si riferisce contestualmente a più specie o generi (risorse genetiche vegetali, risorse genetiche microbiche, etc.).

Da quando l'uomo sviluppò l'agricoltura sono stati gli agricoltori-propagatori a preservare i semi dalla raccolta alla successiva stagione di semina. L'idea di conservare semi di diverse specie da tutto il mondo in strutture capaci di garantire una vitalità a lungo termine, è nata all'inizio del secolo scorso con lo studioso russo Nikolai Vavilov (Koo *et al.*, 2004). Una nazione immensa e povera qual'era la Russia, chiedeva a Vavilov di aumentare le rese delle specie per uso alimentare ed industriale tramite il miglioramento genetico. Per raggiungere l'obiettivo, in quasi trent'anni sono state create e ordinate scientificamente immense collezioni; questo germoplasma, così conservato *ex situ*, delineava una delle procedure per preservare la biodiversità vegetale.

Le strutture che oggi custodiscono la biodiversità contenuta nel germoplasma si chiamano banche del germoplasma (diffuso anche il termine inglese *genebanks*), oppure banche del seme (*seed-banks*), se il materiale prevalentemente conservato è quest'ultimo.

I campioni di materiale raccolto che vengono introdotti nelle banche del germoplasma per essere conservati si chiamano tecnicamente "accessioni". Ogni accessione rappresenta l'ingresso in banca di un lotto di germoplasma relativo ad una singola raccolta, per un'unità tassonomica, di una determinata popolazione e viene identificata in modo inequivocabile.

È importante sottolineare che sino a pochi anni orsono le banche dei semi hanno focalizzato la loro attenzione quasi esclusivamente sulla conservazione delle varietà agronomiche e delle loro rispettive specie selvatiche. Il 90% di tutte le accessioni presenti nelle banche dei semi è infatti rappresentato da specie alimentari e da piante comuni che, su scala mondiale, sono riprodotte in modo intensivo e rivestono un'importanza economica fondamentale. Il recente diffondersi di banche dei semi con la vocazione di preservare la flora rara e/o minacciata di estinzione è conseguenza dell'attuazione di specifici obblighi di conservazione come quelli previsti dalla Convenzione sulla Diversità Biologica. Per queste banche i criteri della rarità, della vulnerabilità e dell'endemicità sono i primi ad essere considerati nella scelta del materiale da salvaguardare e rigenerare, senza però tralasciare le entità normalmente considerate marginali, ma ugualmente importanti nel loro contribuire al mantenimento della biodiversità. Grazie anche ad accordi con la FAO, ad oggi ci sono circa milioni accessioni vegetali conservate in merito all'attività di 1.300 banche dei semi. Questo rappresenta però solo una

piccola frazione della biodiversità mondiale e molte importanti regioni del nostro pianeta non hanno ancora pianificato azioni di questo tipo. L'importanza di conservare la diversità è stata dimostrata ed è oggi un valore acquisito. Basti considerare che la vita di tutti dipende, direttamente o indirettamente, dalla diversità biologica perché questa garantisce l'esistenza e persistenza di idonee condizioni per l'ambiente e per l'evoluzione della vita stessa (Perrino *et Terzi, op. cit.*).

1.1 Etica e filosofia della conservazione *ex situ* e *in situ*

Da 10.000 anni a questa parte il germoplasma ed i semi più nello specifico sono stati conservati da chiunque si è occupato della propagazione delle piante per i fini più disparati.

Le banche del germoplasma in senso moderno sono uno dei migliori mezzi per prevenire la perdita di biodiversità genetica e garantire quindi un futuro alle specie in pericolo di estinzione. Nascono, come gran parte delle strutture per la conservazione della biodiversità, con il fine di contrastare l'esponentiale perdita di specie derivante, oltre che dai fenomeni naturali, dalle attività antropiche distruttive e inquinanti gli ambienti naturali. La loro funzione non è solo quella di salvaguardare i semi delle specie in pericolo, ma anche quella di conservare, con le tecniche della conservazione a lungo termine, le spore, i legni, i tessuti e qualsiasi altra struttura che costituisce la biodiversità genetica del pianeta. In questi centri si studiano anche le migliori strategie da attuare per una futura conservazione *in situ* delle specie in pericolo d'estinzione (Bacchetta, 2006).

Le prime banche, intese in tale senso, sono state create all'interno di università o orti botanici alla fine degli anni '50 negli Stati Uniti. In particolare la prima banca è stata quella del laboratorio nazionale per la conservazione dei semi, costituita nel 1958 all'interno del campus dell'Università Statale del Colorado (Hartmann *et Kester*, 1990).

Fino ad alcuni anni fa l'attività delle banche del germoplasma era incentrata sul reperimento e sulla conservazione, generalmente nell'ambito dei territori di pertinenza, del maggior numero di entità rappresentanti la flora minacciata e quella rara. Il loro ruolo era relativo quindi, quasi esclusivamente, alla conservazione *ex situ*.

La creazione di collezioni molto varie e ricche in specie ha però creato problemi di gestione dello spazio e di pianificazione delle attività delle banche. Questo ha portato altresì ad una diminuzione degli standard di conservazione e ad una scarsa rappresentatività dei pool genici relativi alle unità tassonomiche raccolte, non tenendo in debito conto la variabilità genetica interpopolazione e intrapopolazione. Diverse famiglie e generi si sono inoltre rivelati difficili da conservare e soprattutto da rigenerare (es.: *Orchidaceae*). Così pure la conservazione di specie esotiche o con finalità ornamentali, spesso frutto di raccolte finalizzate alla realizzazione di *Index Seminum* o collaborazioni con altri enti ha, in alcuni casi, modificato gli indirizzi di ricerca delle banche, penalizzando le azioni di conservazione della flora autoctona.

Ad oggi l'esperienza maturata in anni di lavoro e di studio ha in parte modificato il vecchio concetto di conservazione *ex situ*, adattandolo ed estendendolo alle reali esigenze del territorio e indirizzandolo verso altre finalità. La filosofia di conservazione si è spostata, soprattutto per i *taxa* in più grave pericolo, verso l'attività *in situ* al fine di preservare le piante direttamente nel loro ambiente naturale, cercando di limitare la raccolta e concentrando parte delle azioni verso la sensibilizzazione e l'informazione. Per tale motivo, si sono moltiplicati gli studi di biologia della conservazione e le conseguenti azioni delle amministrazioni volte alla conservazione *in situ* (es.: reti di microriserve per la conservazione della flora, reti ecologiche per la connettività del territorio, etc.). In questo modo pro-

prietari dei terreni e amministrazioni locali sono stati coinvolti direttamente nelle attività sul campo, nel monitoraggio e nella diffusione delle conoscenze.

L'attività di conservazione *ex situ*, così come è intesa oggi, si sviluppa quindi nella creazione di collezioni rappresentative delle differenti tipologie di habitat presenti in un dato territorio attraverso l'individuazione della variabilità genetica esistente e l'approfondimento della ricerca anche su entità normalmente considerate di interesse marginale. In questo senso, la conservazione *ex situ* deve considerarsi come uno strumento di grande utilità, indispensabile per coadiuvare gli interventi *in situ* e in casi estremi, quali quelli di estinzione in natura di una unità tassonomica, come unica via possibile per la sua stessa preservazione.

I criteri della rarità, della vulnerabilità e dell'endemicità sono sicuramente i primi ad essere considerati nella scelta del materiale da salvaguardare e rigenerare, ma non i soli. Le banche del germoplasma agiscono anche da importanti centri di studio per quanto concerne i *taxa* rappresentativi di habitat e per quelle entità ritenute fondamentali nella ricostituzione di aree degradate o fortemente compromesse. E' proprio in questo contesto che anche le specie pioniere, strutturali o più adattabili vengono prese in esame, conservate e rigenerate. L'intento non è, quindi, solo quello di conservare in banca un grande numero di semi di entità rare, ma di conoscere sotto vari aspetti il germoplasma al fine di garantire la conservazione della biodiversità di un luogo.

Il materiale vegetale conservato *ex situ* deve essere utilizzato per incrementare le conoscenze su biologia ed ecologia delle entità e, in particolar modo, sul loro ciclo riproduttivo, per individuarne i punti di forza e di debolezza e per attivare *ex situ* tutte le strategie da sperimentare successivamente sul terreno dove si intende ricostituire o rafforzare le popolazioni. Risulta anche fondamentale l'elaborazione di tecniche di propagazione, per via sessuale o vegetativa, al fine di assicurare l'effettiva conservazione *ex situ* e la successiva rigenerazione.

Particolare cautela deve quindi essere impiegata nell'utilizzare i semi per l'esecuzione di test di germinazione, di vitalità o per tutte le tipologie di studi e analisi che prevedono la loro distruzione.

Conservare germoplasma nelle banche del seme non è come conservare libri in una scaffalatura di una biblioteca. E' un qualcosa molto più vivo e dinamico: forse somiglia di più alla gestione di animali in un bioparco o alla cura di un orto botanico in quanto i semi sono entità vive che richiedono, per conservarsi bene e a lungo, cure e tecniche specifiche (Koo *et al.*, *op. cit.*).

1.2 Informazione e partecipazione

La delimitazione dell'area geografica di competenza delle banche costituisce un aspetto fondamentale per la determinazione dei programmi e delle politiche di intervento delle stesse¹. Ai fini di una corretta gestione del territorio e di una coerente opera di conservazione e difesa della sua biodiversità, è necessario delimitare l'area geografica di provenienza delle accessioni, attivandosi per la creazione di una rete di contatti e di scambi di informazioni bidirezionali con tutti gli organismi coinvolti normalmente nella protezione della natura e nella sua valorizzazione (amministrazioni locali, parchi, università, orti botanici, giardini e stazioni botaniche, laboratori di ricerca, associazioni, singoli appassionati, etc.). E' in questo contesto che si può rendere possibile la collaborazione e lo scambio di germoplasma, di risorse finanziarie nonché di conoscenze specifiche. Nel perseguire questo obietti-

¹ Le banche possono, altresì, occuparsi di determinate categorie di materiale come, ad esempio, le sole specie forestali oppure le spore di funghi o pteridofite.

vo, ogni banca deve essere strutturata in modo tale da poter garantire che il prelievo di materiale avvenga nel pieno rispetto delle normative vigenti a livello regionale e nazionale, nonché delle principali normative e convenzioni internazionali che regolamentano il settore (v. 2.1 e 2.2). A tal fine ogni banca cura con attenzione la formazione e l'aggiornamento continuo, rilasciando appositi permessi e/o autorizzazioni, che attestino la preparazione culturale e tecnica dei suoi collaboratori, evidenziando il fine scientifico e conservazionistico della raccolta (salvo casi in cui intervengano convenzioni specifiche).

Il ruolo della banca si esprime, oltre che nella divulgazione pubblica delle sue iniziative, anche nella creazione di una proficua rete di collaboratori a vari livelli, con i quali avvia ed alimenta lo scambio delle conoscenze e l'aggiornamento sull'avanzamento dei lavori. Il coinvolgimento dei raccoglitori implica pertanto l'informazione periodica sui piani di gestione delle entità da loro fornite con l'intento di renderli partecipi alle finalità del progetto e motivandoli alla prosecuzione della collaborazione. A tutti i soggetti coinvolti viene fornito un elenco delle entità botaniche di interesse locale, le schede specifiche per la raccolta del germoplasma (v. 13.1) e quelle per la caratterizzazione delle popolazioni (v. 13.3).

2. QUADRO NORMATIVO E CONVENZIONI SULLA TUTELA DELLA BIODIVERSITA'

2.1 Normative e convenzioni internazionali

La tutela della biodiversità vegetale è disciplinata da trattati e convenzioni internazionali, da direttive e regolamenti comunitari e da leggi a carattere nazionale e regionale; di seguito vengono elencate, in senso cronologico, le principali normative sino ad oggi approvate a vario livello.

2.1.1 Convenzione di Washington – CITES

La convenzione CITES (1973) “sul commercio internazionale delle specie minacciate di estinzione”, è stata adottata con il Reg. (CE) n. 338/1997 dall’Unione Europea e ratificata in Italia con legge 19 dicembre 1975, n. 874; le modalità d’applicazione del regolamento sono individuate nel Reg. (CE) n. 1808 del 30 agosto 2001 (CE, 2001).

Nell’Allegato I della convenzione vengono riportate le specie in pericolo di estinzione che sono o possono essere danneggiate dal commercio; l’Allegato II indica le specie che pur non essendo attualmente in pericolo di estinzione, potrebbero esserlo in futuro qualora il commercio non sia soggetto a rigida regolamentazione; l’Allegato III riporta le specie identificate da una parte contraente il cui commercio deve essere soggetto a regolamentazione.

Per l’importazione, l’esportazione, la riesportazione e l’introduzione delle specie incluse nei suddetti allegati è necessario ottenere, per ogni singola spedizione, secondo le disposizioni degli artt. 3, 4 e 5 della Convenzione, un certificato conforme alle disposizioni dell’art. 6, secondo lo schema riportato nell’Allegato IV. Questo permesso, emesso da una Autorità Amministrativa dello Stato di appartenenza, ha una validità di sei mesi a partire dalla data di rilascio. Le disposizioni contemplate dagli stessi articoli, non vengono applicate a scambi tra scienziati o istituzioni scientifiche registrate, per l’Italia, presso il Ministero dell’Ambiente - Servizio Conservazione della Natura, ai sensi del Decreto Ministeriale del 23 marzo 1994, che abbiano per oggetto germoplasma o *exsiccata* muniti di cartellino come riportato nell’Allegato IV del Reg. (CE) 1808/2001.

Con il Regolamento (CE) n. 349/2003 del 25 febbraio 2003, la Commissione Europea ha sospeso l’introduzione, nel territorio dell’UE, di esemplari delle specie di fauna e flora selvatiche riportate negli allegati. Questi ultimi, aggiornati al 23 giugno 2005, sono disponibili e scaricabili in rete all’indirizzo <http://www.cites.org/>.



Figura 1 - *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea*, specie protetta dalla Convenzione di Washington. (foto: R. Guarino)

2.1.2 Convenzione di Berna

La Convenzione di Berna, “sulla protezione della vita selvatica e dell’ambiente naturale in Europa”, firmata dagli stati membri nel 1979 e ratificata dall’Italia nel 1981 (Legge n. 503/81), riporta nell’Allegato I l’elenco delle specie di flora selvatiche rigorosamente protette, per le quali è vietata la raccolta, la collezione, il taglio e lo sradicamento intenzionale (CEE, 1982). L’art. 9 della Convenzione prevede comunque che ogni parte contraente possa concedere delle deroghe all’art. 5, “(...) *nell’interesse della protezione della flora e della fauna; per prevenire importanti danni a colture, bestiame, zone boschive, riserve di pesca, acque ed altre forme di proprietà; nell’interesse della salute e della sicurezza pubblica, della sicurezza aerea, o di altri interessi pubblici prioritari; per fini di ricerca e educativi, per il ripopolamento, per la reintroduzione e per il necessario allevamento; per consentire, sotto stretto controllo, su base selettiva ed entro limiti precisati, la cattura, la detenzione o altro sfruttamento giudizioso di taluni animali e piante selvatiche in pochi esemplari.*”

2.1.3 Prima Conferenza Interministeriale per la Protezione dei Boschi in Europa

Nell’ambito delle risorse genetiche forestali, la Prima Conferenza Interministeriale per la Protezione dei Boschi in Europa, svoltasi a Strasburgo nel 1990, ha affrontato la conservazione di tali risorse ed ha stimolato la presa di decisioni collegiali a livello paneuropeo. Si è cercato di dare vita a strategie comuni considerato il carattere transfrontaliero delle risorse genetiche, la responsabilità necessariamente condivisa e la maggiore efficacia della conservazione della variabilità intraspecifica che si può ottenere con questa filosofia. E’ stata perciò proposta la cooperazione tecnico-scientifica attraverso una serie di azioni e risoluzioni. In particolare la risoluzione n. 2, che riguarda la conservazione di risorse genetiche forestali, si basa sui seguenti principi:

- applicazione di azioni immediate considerate le risorse disponibili;
- privilegiare l’impiego di metodi semplici ed assicurare loro applicazione nel lungo periodo;
- conservare tutti i livelli di variabilità genotipica;
- sottolineare l’applicazione di metodi *in situ* integrati nella gestione forestale, complementati, quando necessario, con la conservazione *ex situ*;
- conservare sia specie sia ecosistemi forestali rari;
- implementare a livello nazionale specifiche misure per la conservazione delle risorse genetiche in base ai principi appena enunciati, con particolare riguardo per le tecniche selvicolturali e la movimentazione e gestione del materiale forestale di moltiplicazione.

2.1.4 Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD)

La Convenzione sulla Diversità Biologica, firmata da 150 nazioni nel corso della Conferenza delle Nazioni Unite sull’ambiente e lo sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro dal 3 al 14 giugno 1992, rappresenta la prima iniziativa a scala planetaria per la conservazione della biodiversità e definisce le linee guida per l’elaborazione di strategie comuni volte alla salvaguardia di entità animali, vegetali e habitat, introducendo i concetti di conservazione *in situ* ed *ex situ* (Williams *et al.*, 2003). Tale convenzione è stata ratificata dall’Italia con la Legge n. 124 del 14 febbraio 1994.

2.1.5 Direttiva 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali, della flora e della fauna selvatica

Rappresenta il principale strumento per la protezione delle specie di interesse comunitario.

La Direttiva (EC, 1992) è stata recepita in Italia con il DPR 357/97² che riporta nell'allegato B³ (All. 2 della Direttiva) (fig. 2) le “specie animali e vegetali di interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di Zone Speciali di Conservazione”; in quello D (All. 4 Direttiva) le “specie animali e vegetali di interesse comunitario che richiedono una protezione rigorosa” e in quello E (All. 5 Direttiva) le “specie animali e vegetali di interesse comunitario il cui prelievo nella natura e il cui sfruttamento potrebbero formare oggetto di misure di gestione”.

Per le specie inserite negli allegati B e D del DPR 357/97, è vietata qualsiasi forma di prelievo; tuttavia il Ministero dell'Ambiente (art. 11 DPR 357/97) può autorizzare il prelievo, in deroga alle prescrizioni previste, “*per finalità didattiche e di ricerca, di ripopolamento e reintroduzione di tali specie e per operazioni di riproduzione necessarie a tal fine, compresa la riproduzione artificiale delle piante*”.



Figura 2 - *Brassica insularis* Moris, specie inclusa nella DIR. 92/43/CEE. (foto: G. Bacchetta)

2.1.6 Direttiva 1999/105/CE relativa alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione

Il Decreto Legislativo n. 386, approvato alla fine del 2003, recepisce i contenuti della Direttiva 1999/105/CE del Consiglio Europeo, relativa alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione.

La Direttiva 105 introduce, nell'ambito delle problematiche forestali, i concetti di “sviluppo sostenibile” e “biodiversità” e prevede che “(...) *gli Stati membri stabiliscano un elenco delle regioni di provenienza che precisi l'origine dei materiali di base; (...)*” e che “(...) *la demarcazione delle regioni di provenienza deve essere indicata dagli Stati membri tramite la redazione e pubblicazione di apposite mappe (...)*”.

La norma si applica alla produzione a fini di commercializzazione e alla commercializzazione stessa di materiale di propagazione per fini forestali appartenenti ad oltre 70 specie.

Una delle novità introdotte dal decreto è rappresentata dal concetto di “regione di provenienza”; con tale definizione si intende “il territorio o l'insieme di territori soggetti a condizioni ecologiche sufficientemente uniformi e sui quali si trovano soprassuoli o fonti di semi sufficientemente omogenei dal punto di vista fenotipico e, ove valutato, dal punto di vista genotipico, tenendo conto dei limiti altimetrici ove appropriato”.

² Modificato dal DPR 120/03

³ Allegato modificato dal DM 20 gennaio 1999 che recepisce la DIR. 97/62/CE

Il D.Lgs. classifica i materiali forestali di propagazione in quattro categorie:

- identificati alla fonte: provenienti da materiali di base prodotti da una fonte di semi o da un soprassuolo ubicati in una singola regione di provenienza;
- selezionati: in questo caso il materiale deve essere anche fenotipicamente selezionato e rispondere a requisiti in merito a origine, isolamento, entità della popolazione, età e sviluppo, omogeneità, forma e portamento, stato sanitario, produzione quantitativa, qualità del legno;
- qualificati: materiale di propagazione proveniente da arboreti, da cultivar selezionate, da cloni o loro miscugli, i cui componenti siano stati fenotipicamente selezionati a livello individuale e che soddisfino determinati requisiti;
- controllati: materiali la cui superiorità è stata dimostrata per mezzo di prove comparative.

La produzione, conservazione, commercializzazione e distribuzione a qualsiasi titolo di materiale soggetto alla disciplina del decreto sono subordinate al conseguimento di apposita licenza (art. 4) rilasciata dall'organismo ufficiale. Tali disposizioni non si applicano agli Istituti universitari, agli Enti pubblici di ricerca e sperimentazione, nonché ai Centri nazionali per la conservazione della biodiversità forestale relativamente ai materiali forestali di moltiplicazione usati esclusivamente a fini di ricerca e sperimentali.

Entro un anno dalla data di entrata in vigore del decreto (art. 10), le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano devono istituire un registro dei materiali di base delle specie elencate nell'allegato I presenti nel proprio territorio.

La demarcazione delle regioni di provenienza deve essere indicata tramite la redazione e pubblicazione di apposite cartografie, realizzate secondo criteri omogenei. Le cartografie vengono inviate al Ministero e, tramite questo, alla Commissione Europea e agli altri Stati membri.

2.2 Normativa e provvedimenti nazionali collegati

A livello nazionale manca ad oggi una legge organica di tutela della flora, in quanto con due atti legislativi (DPR 616/1977 e L. 984/77), lo Stato ha delegato alle Regioni le funzioni relative alla protezione delle bellezze naturali e le funzioni amministrative concernenti gli interventi per la protezione della natura, nonché l'obbligo di tutelare la flora spontanea.

Le uniche norme a livello nazionale per la difesa della flora sono il Regio Decreto n. 3267 del 1923 di riordino e riforma della legislazione dei boschi e terreni montani detta anche "Legge Forestale", la legge a tutela dell'olivo (Legge 144/51 e DPR 10/06/1955) e la legge 06/01/1931 per la "Disciplina della coltivazione, raccolta e commercio delle piante officinali".

2.2.1 DM 22 dicembre 1992 "Metodi ufficiali di analisi per le sementi"

I metodi ufficiali di analisi per le sementi (Ministero Agricoltura e Foreste, 1993) costituiscono le norme con cui in Italia si determina la qualità dei semi di specie erbacee, arboree, arbustive, floricole e officinali, siano esse coltivate o meno. Vengono aggiornati con una certa periodicità e recepiscono norme internazionali. Sono di particolare importanza nel commercio dei semi dove il prezzo è funzione della qualità. Nell'allegato al decreto sono illustrati in dettaglio i metodi di campionamento, l'analisi della purezza, il test di germinabilità (con la specifica delle condizioni a cui devono essere condotte le prove per ogni specie), la determinazione della vitalità con saggio biochimico (colorimetrico), il calcolo dell'umidità dei semi, la determinazione del peso di 1000 semi, l'analisi dei semi confettati (o ricoperti) e varie altre prove.

2.2.2. Proposta di Piano Nazionale sulla Biodiversità

Una proposta di Piano Nazionale sulla Biodiversità è stata redatta dal Comitato di consulenza per la Biodiversità e la Bioetica del Ministero dell'Ambiente con D.M. 97/568 del 15 maggio 1997.

Tale strumento nasce come atto dovuto a seguito della Conferenza di Rio de Janeiro del 1992 ed alla relativa Convenzione sulla Diversità Biologica sottoscritta dall'Italia nel 1994. Esso racchiude numerosi obiettivi, tra i quali si evidenziano, per l'attinenza agli argomenti trattati in questo manuale, i seguenti:

- obiettivo 3 "Educazione e Sensibilizzazione", azione 3.1.2 e 3.3.1 "Centri per la Biodiversità"; az. 3.2.1 "Formazione professionale"; 3.3.3 "Campagne informative";
- obiettivo 4 "Conservazione *in situ*", ob. 4.3 "Restauro e riabilitazione degli ecosistemi degradati, difesa e recupero delle specie minacciate";
- obiettivo 7 "Conservazione *ex situ*", ob. 7.1 "Realizzazione di una rete integrata di centri di conservazione del germoplasma"; az. 7.1.1 "Censimento delle collezioni di germoplasma"; az. 7.1.2 "Istituzione di una banca dati accessibile con sito web"; az. 7.2.2. "Rinnovamento collezioni ed ampliamento"; az. 7.2.3 "Istituzione di nuovi centri per la conservazione"; az. 7.2.4 "Istituzione di vivai per la produzione di specie autoctone";
- obiettivo 9 "Cooperazione internazionale ed ecodiplomazia".

Dalla lettura di questo documento emerge con evidenza la necessità di creare un'unità nazionale che sappia operare con strumenti adeguati, da sviluppare e condividere tra gli enti che si occupano di biodiversità.

2.3 Normativa ed Autorizzazioni Regionali

Quasi tutte le Regioni e le Province Autonome dispongono di specifici provvedimenti e molte di queste hanno redatto liste di specie protette. Alcune Regioni hanno emanato norme per la protezione di tutta la flora spontanea. Una regione dispone di una legge per la tutela della flora, ma non ha prodotto liste di specie (Marche). Poche Regioni (Puglia, Sardegna e Sicilia) non hanno ancora legiferato in materia.

Leggi per la protezione della flora delle Regioni e Province Autonome:

Regione/Provincia Autonoma	anno di emanazione
Abruzzo	1979
Basilicata	2005
Bolzano	1972
Calabria	2001
Campania	1994
Emilia Romagna	1977
Friuli Venezia Giulia	1981
Lazio	1974
Liguria	1984
Lombardia	1979
Marche	1987

Regione/Provincia Autonoma	anno di emanazione
Molise	1999
Piemonte	1982
Puglia	Non emanata
Sardegna	Non emanata
Sicilia	Non emanata
Toscana	2000
Trento	1973
Umbria	1987
Valle d'Aosta	1977
Veneto	1974

2.4 Strumenti di tutela e strategie adottate in campo internazionale

2.4.1 Liste Rosse e Blu del “International Union for Conservation of Nature (IUCN)”

Pur non rappresentando una forma di tutela, la redazione delle liste rosse e blu secondo le categorie IUCN rappresenta comunque uno strumento fondamentale per la protezione della flora. L’inserimento di un *taxon* all’interno delle liste consente, infatti, di acquisire una grande quantità di dati, utili per intraprendere misure di protezione appropriate. A seconda dei dati a disposizione un *taxon* può essere inserito in una delle seguenti categorie (Pignatti *et al.*, *op. cit.*; IUCN, 1994 e 2001):

- Estinta (EX)
- Estinta in natura (EW)
- Gravemente minacciata (CR)
- Minacciata (EN)
- Vulnerabile (VU)
- Quasi minacciata (NT)
- A rischio relativo (LC)
- Dati insufficienti (DD)
- Non valutata (NE)

I criteri per l’inserimento dei *taxa* nelle diverse categorie sono codificati sia a livello nazionale che regionale, secondo gli standard internazionali della IUCN (2003a; 2003b). Per quanto riguarda l’Italia, le opere di riferimento relative alle liste della IUCN sono quelle di Conti *et al.* (1992 e 1997). Recentemente è stata inoltre redatta una lista rossa aggiornata al 2005 per quanto riguarda tutte le specie in pericolo d’estinzione d’Italia a cura di Scoppola e Spampinato (2005) e una checklist delle 50 specie più in pericolo nel Mediterraneo denominata “TOP 50 Mediterranean Island Plants” (de Montmollin *et al.* Strahm, 2005) (fig. 3).



Figura 3 – *Lamyropsis microcephala* (Moris) Dittrich *et* Greuter, specie gravemente minacciata (CR) inserita dall’IUCN tra le “TOP 50 Mediterranean Island Plants”. (foto: E. Mattana)

2.4.2 Global Strategy for Plant Conservation (GSPC)

Si tratta di un piano strategico a livello globale emanato nel 2002 (Decisione VI/9), promosso dal Segretariato della Convenzione sulla Biodiversità (CBD) dell'ONU e da *United Nations Environment Programs* (UNEP), in associazione con il *Botanic Garden Conservation International* (BGCI). Tra i vari obiettivi raccomanda la conservazione *ex situ* del 60% delle specie minacciate, prioritariamente nel paese d'origine di tali entità, e l'avvio di progetti di moltiplicazione e reintroduzione sul 10% di queste specie, entro il 2010 (obiettivo 8).

La strategia prevede esplicitamente che nessuna pianta selvatica debba essere messa in pericolo a causa del commercio o di uno sfruttamento non sostenibile e che almeno il 30% dei prodotti di origine vegetale devono provenire da risorse gestite in modo sostenibile.

L'importanza della diversità vegetale e la necessità della sua conservazione deve essere incorporata nei programmi di comunicazione e sensibilizzazione dell'opinione pubblica.

Al fine di perseguire tali obiettivi, la GSPC incentiva la creazione, o il rafforzamento, di reti per la conservazione delle piante a livello regionale, nazionale e internazionale.

2.4.3 European Strategy for Plant Conservation (ESPC)

Adottata dal Consiglio d'Europa nell'aprile 2002 su proposta di Planta Europa, come contributo europeo all'implementazione della GSPC, raccomanda per quanto riguarda l'Unione Europea di provvedere a conservare *ex situ* l'80% delle specie a rischio di scomparsa, sempre entro il 2010.

La strategia prevede inoltre la conservazione efficace di almeno il 10% di ognuna delle regioni ecologiche del mondo e la protezione di almeno il 50% delle più importanti aree per la diversità vegetale.

Per quanto riguarda le specie esotiche è auspicata la redazione di piani di gestione *in loco* per almeno 100 tra le principali entità invasive che minacciano piante, comunità vegetali e relativi habitat ed ecosistemi.

Per le entità vegetali e per i funghi viene indicata la necessità di elaborare programmi nazionali di monitoraggio e, se necessario, regolamentare la raccolta e il commercio, al fine di perseguire la sostenibilità. Anche la ESPC sottolinea che l'importanza della diversità vegetale e la necessità della sua conservazione deve essere incorporata nei programmi di comunicazione e sensibilizzazione dell'opinione pubblica.

La ESPC incentiva la creazione o il rafforzamento di reti per la conservazione delle piante a livello regionale, nazionale e internazionale, anche attraverso l'individuazione di risorse economiche quali i finanziamenti nazionali e internazionali per i programmi di conservazione, ampliamento dell'utilizzo dei fondi Life, etc.

2.4.4 Global 200

La conservazione e la gestione del territorio a scala di paesaggio o ecosistemica è alla base di un processo noto come conservazione ecoregionale (ERC, *EcoRegional Conservation*) che si sta rapidamente affermando come una efficace strategia, necessaria per il raggiungimento di risultati consistenti e funzionali al mantenimento della vita sulla Terra. La campagna dedicata alla promozione dei contenuti di questo processo è stata lanciata dal WWF nel 1996 con il nome "Global 200".

L'iniziativa si pone come obiettivo principale la conservazione del più ampio numero di specie, comunità, habitat e processi ecologici caratteristici di una determinata ecoregione.

Al 2003 sono state individuate, complessivamente, 238 ecoregioni prioritarie tra terrestri, marine e d'acqua dolce, indicate per brevità come Global 200.

Il mantenimento e la corretta gestione di queste 238 ecoregioni a livello globale può garantire la salvaguardia della massima area possibile in funzione della superficie minima necessaria richiesta. L'obiettivo è quindi quello di salvaguardare le aree di maggior estensione che conservano le migliori condizioni ambientali e di conservazione. In altre parole, ognuna delle ecoregioni della lista delle Global 200, identifica l'ecoregione più significativa di ciascun tipo di habitat, in ciascun dominio biogeografico nel quale si trova (Bulgarini *et al.*, 2003).

2.5 Accesso alle risorse genetiche

Negli ultimi anni ha assunto notevole rilevanza il tema dell'accesso alle risorse genetiche, in particolar modo per quelle aventi un interesse economico attuale o potenziale, e quello della diffusione dei benefici che derivano dal loro impiego.

L'importanza di affrontare questi argomenti è stata manifestata in numerosi congressi e conferenze. Nel caso di specie agricole il "Trattato Internazionale sulle risorse genetiche per l'alimentazione e l'agricoltura", strumento vincolante nato in seno alla FAO nel 2001 (FAO, 2001), stabilisce un sistema multilaterale per facilitare l'accesso alle risorse genetiche di una serie di specie agricole e un meccanismo per la distribuzione dei benefici che ne derivano.

In termini più ampi la "Conferenza sulla Diversità Biologica" del 1992, fissa come obiettivo, oltre la loro conservazione ed utilizzazione sostenibile, la partecipazione giusta ed equa dei benefici che derivano dall'uso delle risorse genetiche.

Tale convenzione, nel suo art. 15, riconosce la sovranità degli Stati sulle loro risorse genetiche. Allo stesso tempo, raccomanda la creazione di condizioni che facilitino l'accesso alle risorse per impieghi di carattere ambientale adeguati, in condizioni convenute mutualmente tra le parti contraenti, con l'obiettivo di assicurare la partecipazione ai benefici. Inoltre si stimola ogni parte contraente a promuovere e realizzare ricerche scientifiche incentrate sulle risorse genetiche in collaborazione con le altre parti.

Nell'ambito della CBD si sono elaborate le "Direttive di Bonn sull'Accesso alle Risorse Genetiche e sulla Partecipazione Giusta ed Equa ai Benefici Provenienti dalla loro Utilizzazione", adottate nel 2002. Tali direttive si pongono come obiettivo l'individuazione di strategie d'accesso ai benefici mediante l'identificazione dei passi da seguire in tali processi, dei requisiti fondamentali dei termini degli accordi e della partecipazione e responsabilità delle parti. In tale documento si trattano, tra l'altro, aspetti come gli incentivi, i mezzi di supervisione e verifica e le soluzioni delle controversie. Infine le direttive propongono una serie di elementi da tenere in considerazione negli accordi di trasporto del materiale, come una lista di possibili benefici economici e non.

Anche se le Direttive di Bonn sono uno strumento volontario, si considera che la loro messa in pratica da parte dei centri che gestiscono in qualche modo risorse genetiche, deve essere stimolata poiché con esse si stabiliscono relazioni trasparenti ed eque, si rafforza la credibilità delle istituzioni e si facilita il raggiungimento degli obiettivi della CBD.

3. RETI DI BANCHE DEL GERMOPLASMA

Attualmente le banche del germoplasma in tutto il mondo sono circa 1.300, distribuite essenzialmente nei paesi industrializzati, soprattutto in quelli anglosassoni. In Europa se ne contano circa 150, di cui una ottantina nei paesi nord europei e settanta nell'area mediterranea; queste ultime sono distribuite essenzialmente in Italia, Francia, Grecia e Spagna (Bacchetta, *op. cit.*).

Ad oggi, nel campo della conservazione *ex situ* della biodiversità, ogni istituzione ha maturato una propria esperienza, elaborando protocolli e metodologie differenti funzionali alle proprie risorse umane ed economiche ed alle strumentazioni a disposizione. A seguito di un sempre maggiore sviluppo delle tematiche relative alla conservazione e data l'esigenza di una sempre più stretta collaborazione ed interscambio di germoplasma, dati e conoscenze, si rende necessaria una coordinazione a livello di rete. In Europa, sia a livello dei singoli paesi sia a livello comunitario, sono presenti diverse realtà nate con lo scopo di coordinare le attività delle banche del germoplasma.

3.1 Reti nazionali

3.1.1 Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea italiana (RIBES)

In Italia non si contano più di 20 banche del germoplasma, tra queste le più importanti sono quelle presenti negli orti botanici universitari di Cagliari (BG-SAR), Catania, Pavia (LSB), Palermo, Pisa e Roma, quella della Provincia Autonoma di Trento (TSB) e quella dell'Istituto del Germoplasma di Bari, gestita dal Centro Nazionale per le Ricerche (CNR).

La prima è stata quella di Lucca, nata circa 30 anni fa dalla collaborazione con l'Azienda regionale per lo sviluppo e l'innovazione del settore agricolo. In questa banca vengono conservate essenzialmente specie d'interesse agricolo ed in particolare cultivar e varietà ortive e foraggere. Nella banca del CNR di Bari si conserva materiale d'interesse agricolo e solo secondariamente di specie spontanee, mentre in quelle poste all'interno degli orti botanici universitari vengono conservate a lungo termine e a basse temperature quasi esclusivamente specie autoctone della flora italiana. La banca di Pisa è specializzata per la flora toscana e dell'Arcipelago Toscano, quella di Palermo conserva il germoplasma di specie spontanee e coltivate dell'area mediterranea, quella di Cagliari ha concentrato gli sforzi sulla conservazione delle specie del Mediterraneo occidentale insulare (Bacchetta, *op. cit.*).

Considerata la mancanza di un raccordo istituzionale per il coordinamento nazionale della conservazione *ex situ* di piante spontanee nel territorio italiano, alcuni gruppi impegnati nel settore hanno concordato la costituzione di una rete nazionale di banche del germoplasma. Come primo passo, è stato approvato il testo di un protocollo d'intesa per dar vita alla "Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea" denominata RIBES; essa si occupa di progetti a livello nazionale, riguardanti specie a rischio di estinzione e utili per la rinaturalizzazione. Il protocollo d'intesa, firmato a Pavia il 9 febbraio 2005, ha costituito la base per la definizione formale della rete in forma di organismo avente personalità giuridica riconosciuta. La rete rappresenta oggi una associazione scientifica, senza scopo di lucro, che opera prioritariamente per la conservazione *ex situ* della biodiversità vegetale autoctona italiana. Lo statuto della RIBES è stato firmato dai 18 soci fondatori (fig. 4) il 3 dicembre 2005 a Trento.

Per raggiungere i propri scopi RIBES ha elaborato anche un primo piano d'azione che ha come obiettivo generale il miglioramento della qualità e della sicurezza delle riserve di germoplasma di specie vegetali spontanee in Italia. Questo piano viene attuato tramite l'istituzione di gruppi di lavoro dedicati a ben precisi ambiti d'azione quali l'acquisizione del germoplasma, il suo trattamento nelle banche, la gestione dei dati e le attività di formazione, diffusione e divulgazione.

I gruppi di lavoro si sono formalmente costituiti durante la prima assemblea ordinaria tenutasi a Pisa a marzo 2006, sono governati in modo partecipativo, definiscono le priorità di azione a livello nazionale, individuano le possibili metodologie di lavoro, indicano i requisiti minimi per le strutture aderenti e suggeriscono le soluzioni migliori da mettere in atto compatibilmente con le disponibilità di risorse umane e materiali (Bedini *et al.*, 2005).

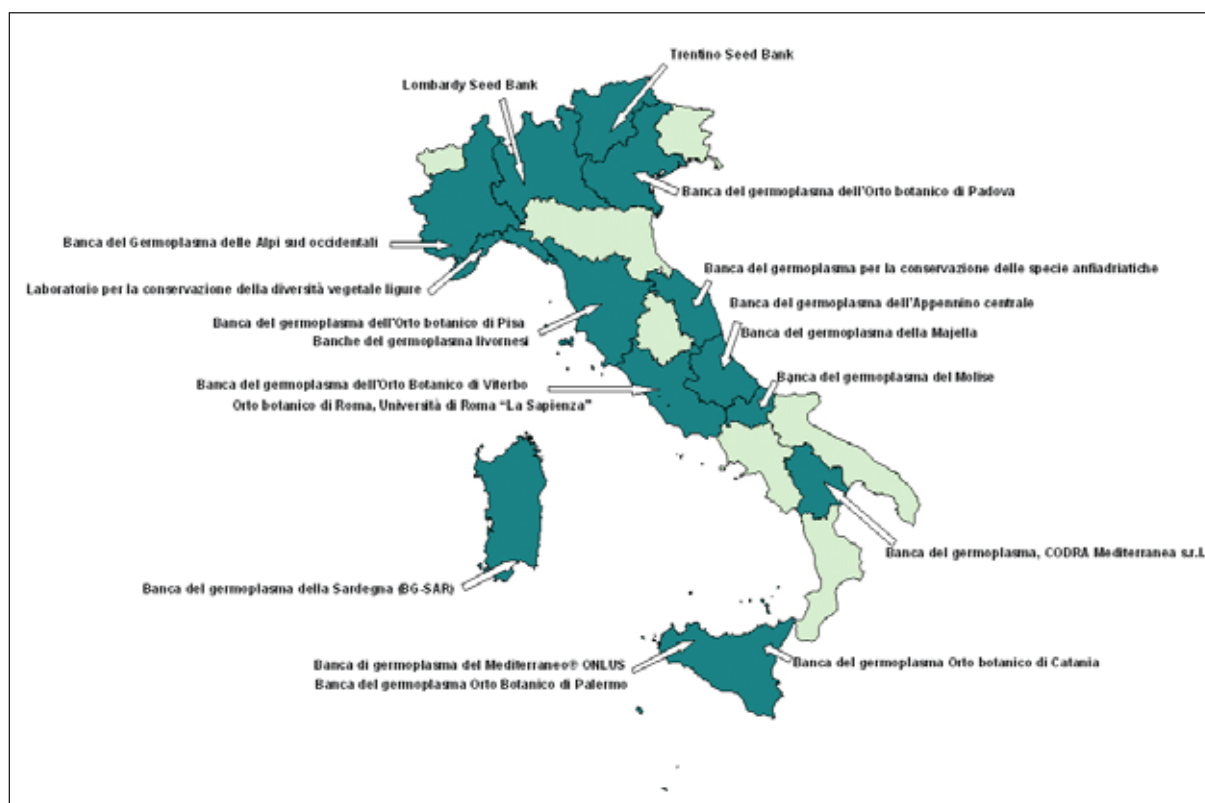


Figura 4 - RIBES: nodi regionali della rete (in colore scuro vengono segnalate le regioni nelle quali sono presenti strutture per la conservazione del germoplasma).

3.1.2 Red Española de Bancos de Germoplasmas de Plantas Silvestres (REDBAG)

Nel novembre del 1992 i membri dell'Associazione Ibero-Macaronesica dei Giardini Botanici (AIMJB), che si occupano della gestione del germoplasma, hanno dato vita, con la collaborazione del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università Politecnica di Madrid, alla "Red Española de Bancos de Germoplasmas de Plantas Silvestres" – REDBAG.

REDBAG è aperta a tutte le istituzioni che gestiscono banche del germoplasma di specie spontanee o altre risorse genetiche vegetali; i partner della rete si dividono in tre categorie:

- Partner stabili: istituzioni nelle cui banche del germoplasma vengono conservati i semi delle popolazioni della flora spontanea spagnola a medio e lungo termine mediante appropriate strumenta-

zioni e strutture. In particolare fanno parte di tale categoria le seguenti istituzioni: Departamento de Biología Vegetal UPM, BGVA de Andalucía e Jardín Botánico de Córdoba, Jardí Botànic de la Universitat de València, Real Jardín Botánico de Madrid, Jardín Botánico Viera y Clavijo, Real Jardín Botánico Juan Carlos I, Jardín Botánico La Concepción, Jardín Botánico de Marimurta e Jardín Botánico de Soler (Hernández Bermejo *et* Herrera Molina, 2005).

- Partner in fase di consolidamento: istituzioni le cui banche del germoplasma sono ancora in una fase di sviluppo sotto la guida di un partner stabile.
- Partner potenziali: istituzioni che stanno realizzando delle banche del germoplasma o che comunque hanno dei progetti ben definiti in tal senso. Le istituzioni che sono dotate di una banca del germoplasma ma non appartengono alla AIMJB sono considerati partner invitati.

Attualmente tale rete non risulta ufficialmente istituita e riconosciuta a livello nazionale, ma opera attivamente per la conservazione *ex situ* della diversità vegetale e alcuni soci della stessa partecipano a progetti internazionali quali “Genmedoc” (v. 3.2.1) ed “Ensconet” (v. 3.2.2).

3.1.3 Istituzione della Rete delle Banche del germoplasma forestale spagnole

Il Ministero dell’Ambiente spagnolo, in sinergia con le amministrazioni autonome, ha elaborato la “Strategia spagnola per la conservazione e l’uso sostenibile delle risorse genetiche forestali”. In questo documento è prevista, insieme ad altre azioni e misure, la creazione di una “Banca del germoplasma forestale in rete”, cui possono aderire volontariamente le diverse istituzioni che si dedicano alla conservazione *ex situ*.

Le finalità sono quelle della conservazione *ex situ* delle risorse genetiche relative alle specie forestali, creando collezioni di base dei differenti materiali di riproduzione ed utilizzando diverse strategie e in particolare: semi o pollini, collezioni vive in campo o altre che richiedono un maggiore supporto tecnologico, come il mantenimento *in vitro* o la crioconservazione. Allo stesso tempo questa banca del germoplasma in rete consentirà l’approvvigionamento del materiale necessario per eventuali attività *in situ*, così come la messa a disposizione del materiale genetico necessario per le analisi genetiche e i programmi di miglioramento, in accordo con i protocolli di accesso alle risorse genetiche che verranno individuati.

La banca verrà organizzata come un nodo virtuale, che fungerà da gestore del registro delle accessioni, coordinatore e divulgatore delle diverse iniziative programmate. L’adesione a questa struttura si concretizzerà attraverso l’accettazione di un protocollo che prevede una serie di requisiti e obblighi ai quali attenersi.

E’ inoltre prevista la creazione di un laboratorio virtuale per la valutazione dei materiali forestali di propagazione destinati a un uso sia nel breve sia nel lungo periodo; tale caratterizzazione riguarda, tra l’altro, la valutazione della qualità esterna dei lotti di seme o della qualità dei sementali, la caratterizzazione molecolare, etc.

3.1.4 Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN)

Il primo *Conservatoire Botanique National* francese è stato istituito nel 1990; al primo gennaio 2004 il loro numero ha raggiunto le otto unità e le zone di competenza coprono 78 Dipartimenti relativi al territorio nazionale (fig. 5). Sono allo studio progetti di creazione di nuovi *Conservatoires* per le regioni Aquitania, Poitou-Charentes, Alsace-Franche-Comté-Lorraine e nelle Antille. Il *Ministère de l’écologie et du développement durable* si impegna così a completare la rete dei *Conservatoires* al

fine di coprire l'intero territorio nazionale. Dal 2000 sono riuniti all'interno di una federazione che coordina ed armonizza i loro metodi di lavoro, anima i programmi nazionali di conoscenza e conservazione della flora e degli habitat e apporta il suo sostegno tecnico alla creazione di nuovi *Conservatoires*.

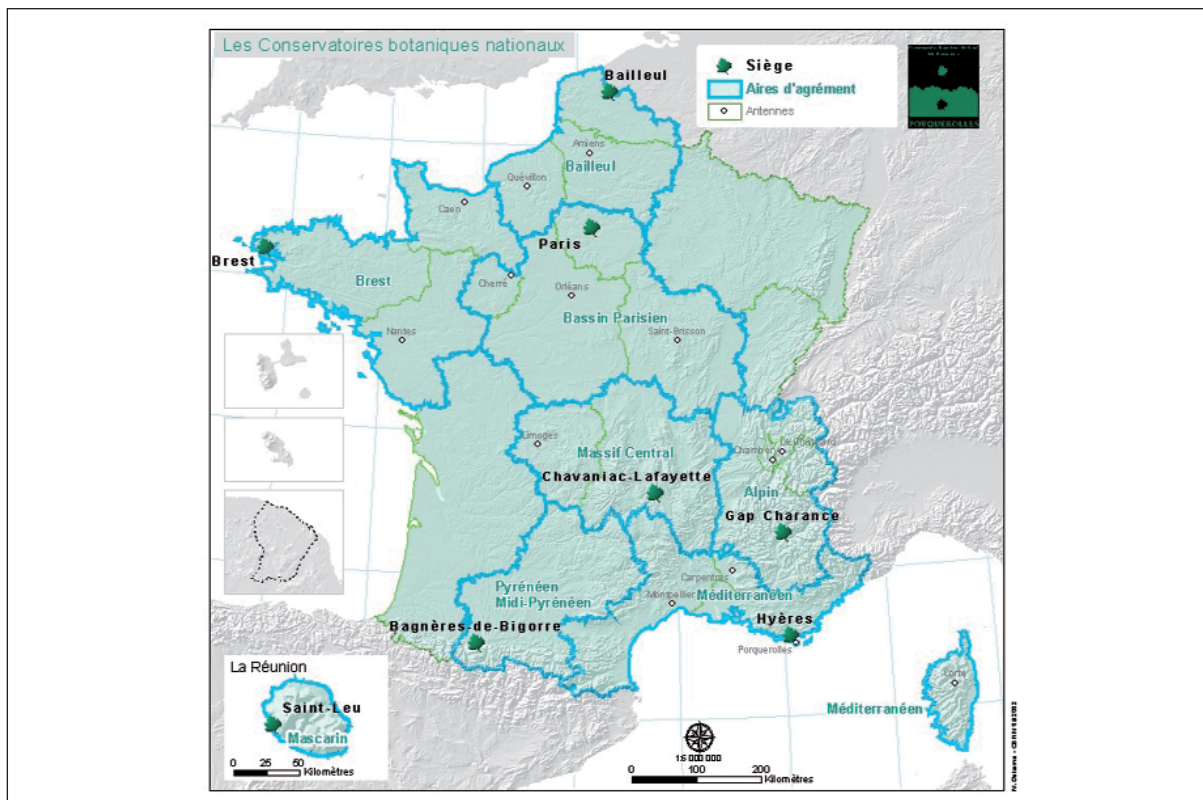


Figura 5 - La rete dei *Conservatoires* con le relative regioni di competenza.

Gli articoli D 416-1 e seguenti del codice dell'ambiente precisano il ruolo ed il funzionamento dei *Conservatoires Botaniques Nationaux*, riconosciuti come istituzioni di carattere scientifico che perseguono i seguenti obiettivi:

1. Conoscenza dello stato e dell'evoluzione della flora spontanea e degli habitat naturali e semi-naturali. Conducono dei rilevamenti, gestendo una banca dati della flora spontanea presente nella propria zona d'intervento con l'obiettivo di classificare secondo un ordine gerarchico il patrimonio naturale (a livello regionale, nazionale ed internazionale). Queste informazioni sono indispensabili per l'attuazione di politiche regionali e nazionali di protezione della natura.
2. Identificazione e conservazione delle entità rare e minacciate della flora spontanea e degli habitat naturali e seminaturali. Elaborano e propongono delle liste di specie da proteggere (specialmente a livello regionale), seguendo la loro applicazione sul campo. Intervengono nella protezione *in situ* delle specie proponendo misure appropriate, giuridiche o contrattuali, per proteggere le piante minacciate nel loro ambiente naturale. Nel campo della conservazione *ex situ*, mettono in atto tecniche di conservazione in vivaio e di conservazione dei semi per congelamento (banche dei semi) al fine di evitare la scomparsa delle specie più minacciate e disporre di scorte di semi per diversi scopi (ricerca, valorizzazione, reintroduzione nell'ambiente naturale, etc.).

-
3. Supporto tecnico e scientifico allo Stato, ai suoi Enti pubblici, agli Enti locali e alle loro aggregazioni per le tematiche relative alla conservazione della flora spontanea e degli habitat naturali e seminaturali.
 4. Informazione ed educazione finalizzata alla conoscenza e alla protezione della diversità vegetale. I *Conservatoires* pubblicano documenti e conducono programmi di sensibilizzazione e divulgazione sulla protezione della flora spontanea, sia verso il grande pubblico che verso un pubblico specializzato (amministratori locali, categorie professionali, etc.).

La certificazione di qualità “*Conservatoire Botanique National*” è rilasciata dal *Ministère de l’écologie et du développement durable*. Le candidature vengono esaminate dalla commissione dei *Conservatoires*. La qualifica, accordata per decreto ministeriale per una durata di 5 anni rinnovabili, viene recepita mediante l’approvazione di un documento programmatico che l’istituzione ammessa è tenuta a rispettare. La certificazione dà il diritto alla denominazione di “*Conservatoire Botanique National*” che è un marchio depositato.

L’autorizzazione è rilasciata per un territorio costituito da un insieme di dipartimenti che presentano caratteristiche biologiche e geografiche comuni.

Tale qualifica può essere revocata se l’attività o il funzionamento dell’istituzione non permettono il rispetto degli obiettivi fissati. Il controllo avviene attraverso la redazione di un rapporto annuale sulle attività svolte e di un documento programmatico, presentati durante la riunione del consiglio scientifico. I *Conservatoires* hanno una conoscenza dettagliata e approfondita della distribuzione delle piante spontanee, della loro biologia e delle loro esigenze ecologiche. La specificità della loro azione e la responsabilità che derivano dalla loro certificazione sono di assicurare, in tutti i modi possibili, il trasferimento di tali conoscenze a tutti quelli che intervengono nella gestione dell’ambiente naturale: comuni, privati, servizi amministrativi dipartimentali o regionali, organismi di gestione forestale, etc. Lo scopo dei loro interventi è quello di evidenziare l’importanza della presenza delle piante minacciate nelle operazioni di gestione e pianificazione che coinvolgono l’ambiente naturale.

3.2 Reti europee

3.2.1 GENMEDOC

Il progetto Genmedoc, “*Création d’un réseau de centres de conservation du matériel génétique de la flore des régions méditerranéennes de l’espace MEDOCC*”, rientra in quelle azioni comuni in materia ambientale dell’Unione Europea per la salvaguardia della biodiversità e la conservazione delle specie e degli habitat. Tali obiettivi vengono perseguiti attraverso lo scambio di informazioni tecniche, l’adozione di strategie e protocolli di lavoro comuni per la conservazione delle risorse genetiche dei *taxa* mediterranei e principalmente di quelli prioritari presenti negli habitat della direttiva 92/43/CEE.

Il progetto Interreg IIIB “Genmedoc” si pone come obiettivo prioritario la costituzione di una rete di centri di conservazione del germoplasma del Mediterraneo occidentale. Alla rete “Genmedoc” afferiscono diversi partner europei consentendo la copertura di gran parte dello spazio Medocc, ivi comprese le più grandi isole del Mediterraneo (Baleari, Corsica, Sardegna, Sicilia e Creta) e un partner tunisino per la costa meridionale. I dieci centri coinvolti (fig. 6) sono: Banc de Llavors Forestals (CIEF) della Regione Valenciana; Centro Conservazione Biodiversità (CCB) del Dipartimento di Scienze Botaniche dell’Università degli Studi di Cagliari; Conservatoire Botanique National Mé-

diterranéen de Porquerolles (Isole Hyères); Dipartimento di Botanica dell'Università degli Studi di Catania; Jardí Botànic dell'Università di València; Fondazione Jardí Botànic de Sóller (Isole Baleari); Mediterranean Agronomic Institute of Chania (Creta); Institut Botànic e Jardí Botànic de Barcelona; Institut des Régions Arides (IRA) di Medenine (Tunisia); Dirección General del Medio Natural della Regione di Murcia.

Gli scopi principali del progetto sono:

- l'elaborazione di modelli comuni di gestione di *taxa* combinando la conservazione *ex situ* (raccolta e conservazione del germoplasma) con quella *in situ* (tutela, recupero e implementazione delle popolazioni naturali);
- lo scambio di conoscenze sulla conservazione del germoplasma (raccolta, trattamento, conservazione e moltiplicazione);
- la duplicazione delle collezioni tra i partner, in modo da garantire la loro effettiva conservazione;
- lo studio dei *taxa* strutturali degli habitat e di quelli endemici, rari o minacciati.

Lo scopo finale è quello di contribuire significativamente allo sviluppo della rete europea NATURA 2000 (oltre 300 specie vegetali selezionate e 40 habitat mediterranei), nata per la conservazione della biodiversità in Europa, in sinergia con i dettati della CBD.

Per la selezione delle specie sono stati concordati tra i partner dei criteri basati in particolare sul loro ruolo strutturale nelle cenosi, la singolarità, intesa come rarità e/o endemicità e il livello di protezione o il grado di minaccia.

Per le specie particolarmente interessanti sono stati elaborati i protocolli di germinazione efficaci, al fine di garantire la possibilità di moltiplicazione del germoplasma da utilizzare in possibili azioni di rinforzo delle popolazioni o di reintroduzione nell'ambiente naturale.

Tutte le informazioni relative al progetto, sulla biodiversità e in particolare sulla conservazione *ex situ*, sono disponibili in rete sul sito ufficiale (<http://www.genmedoc.org>).

Il progetto ha consentito la nascita di collaborazioni interregionali tra i partner, favorendo la collaborazione e interscambio di conoscenze che contribuiranno nel prossimo futuro ad una reale azione di conservazione della flora a rischio di estinzione.



Figura 6 – Partner del progetto Interreg IIIB Genmedoc.

3.2.2 ENSCONET

La rete ENSCONET “*European Native Seed CO*nseRvation *NET*work” riunisce alcune banche dei semi europee con lo scopo di mettere a punto delle procedure operative comuni, coordinare gli sforzi per evitare sprechi e ottimizzare la gestione delle risorse disponibili. Ensconet si propone inoltre di assistere la politica di conservazione dell’Unione Europea nei suoi obblighi verso la CBD e la GSPC attraverso la protezione dei semi ed evitando l’estinzione delle specie spontanee europee.

Il progetto nasce grazie al sostegno finanziario dell’Unione Europea all’interno del VI Programma Quadro a sostegno della ricerca, tramite attività di infrastrutturazione integrata esplicate con azioni coordinate (N. 506109/2003) e comprende 19 istituti europei appartenenti a 12 stati membri, rappresentanti 5 regioni biogeografiche europee. La rete è coordinata dal Royal Botanic Gardens di Kew ed è organizzata in quattro gruppi di lavoro che hanno i seguenti compiti:

- analizzare le collezioni esistenti e individuare le specie e le aree poco rappresentate, dove è quindi necessario effettuare nuove campagne di raccolta;
- migliorare la qualità delle pratiche di conservazione dei semi, mettendo in comune le strutture e le conoscenze acquisite;
- porre le basi per l’integrazione dei database delle diverse istituzioni;
- divulgare i dati prodotti.

4. RACCOLTA DEL GERMOPLASMA

L'identificazione del target delle entità da campionare è funzione della rispondenza ai criteri etici, delle finalità scientifiche di raccolta previste e delle necessità tecniche determinate dalla gestione di un territorio.

Per questa ragione si precisa che alcune delle indicazioni fornite di seguito fanno appello ai principi di selezione delle stazioni e alle metodologie di lavoro relative a entità ampiamente diffuse e/o di interesse alimentare. Tale contesto di attività è difficilmente riscontrabile nell'ambito della conservazione di entità rare, vulnerabili o fortemente compromesse. Si è ritenuto comunque importante, al fine di presentare un panorama completo, fare riferimento anche a queste applicazioni pratiche invitando il raccogliatore ad appellarsi sempre all'esperienza maturata sul campo, al buon senso e alle indicazioni che possono pervenirgli dai curatori delle banche e da chi opera normalmente *in situ*.

4.1 Criteri di scelta delle stazioni

Le metodologie di raccolta applicate dall'operatore si rivelano di importanza cruciale in quanto si pongono come interfaccia tra la variabilità genetica presente in campo e la rappresentazione della stessa nel lotto in ingresso alla banca (Namkoong, 1988).

Per procedere alla raccolta di una popolazione destinata alla conservazione, secondo i Royal Botanic Gardens Kew, devono essere soddisfatte una serie di condizioni relative alla popolazione che in particolare deve:

- essere definibile come “geneticamente differenziata” in base a parametri quali suolo, clima, altitudine, impollinatori, barriere fisiche alla riproduzione incrociata;
- essere selvatica, auto disseminata e non piantata o coltivata;
- consentire il campionamento in modo casuale e uniforme di almeno 50 individui; eccezionalmente, nel caso di popolazioni estremamente ridotte, il numero può essere inferiore;
- consentire la raccolta di un numero di semi compreso tra 10.000 e 20.000; in casi eccezionali, per piante molto minacciate, popolazioni molto ridotte e individui che producono uno scarso numero di semi, la raccolta può essere più limitata;
- avere semi maturi, preferibilmente ancora sulla pianta e pronti alla dispersione;
- non avere semi con alte percentuali di danneggiamento, predazione o aborto.

I criteri di scelta delle stazioni si fondano su parametri stazionali come la distanza geografica interpopolazione, l'altitudine, il clima e gli habitat, oltreché su parametri di natura genetica volti ad individuare la possibile variabilità genetica esistente nel popolamento.

Prima di iniziare le operazioni sul terreno è dunque necessario valutare la disponibilità di informazioni sulle caratteristiche ambientali presenti e sulla distribuzione della specie. Sulla base di queste conoscenze è preferibile dividere in un numero limitato di aree la regione, distinguendole dal punto di vista ecologico, dei caratteri stazionali e dell'uso del territorio.

La scelta delle stazioni, finalizzata al campionamento genetico, è applicabile là dove il *taxon* è presente con uno spiccato polimorfismo, sempre tenendo conto della presenza/assenza di barriere genetiche tra popolazioni e tra specie affini simpatriche. Se la specie è stata segnalata in numerose stazioni, si può iniziare con il campionamento di un numero di popolazioni non inferiore al 50%; se invece l'entità è estremamente rara e si conoscono solo un numero limitato di stazioni, è bene procedere al campionamento di tutte le popolazioni, sempre rispettando i limiti nel prelievo (v. 4.2).

In qualsiasi contesto ci si trovi, la prima cosa da fare deve essere una escursione preliminare sulla stazione prescelta per confermare l'identificazione della o delle entità da raccogliere, per determinare la possibilità della raccolta e il probabile periodo di maturazione del germoplasma.

4.2 Metodi di campionamento

4.2.1 Campionamento genetico

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

Per campionare le risorse genetiche di una certa popolazione è fondamentale, come punto di partenza, valutare la ricchezza in alleli o il numero dei distinti alleli di un singolo *locus*. La ricchezza di alleli di un campione è definibile come la misura diretta della sua qualità (Brown *et* Marshall, 1995). Per i numerosi potenziali usi della collezione di semi che si vuole creare è quindi importante massimizzare il numero degli alleli presenti in un campione, raccogliendo la più grande proporzione possibile di questi rappresentati in una popolazione. L'obiettivo dovrebbe essere quello di includere in un campione almeno una copia del 95% di tutti gli alleli che sono presenti nel target della popolazione. Questo dovrebbe essere assicurato attraverso la raccolta di semi o di altro materiale vegetale da 30 genotipi scelti casualmente nel caso di entità ad impollinazione incrociata o di 59 individui scelti casualmente per le entità autoimpollinate (Brown *et* Marshall, *op. cit.*) nel caso in cui si abbiano conoscenze specifiche sulla modalità di impollinazione del *taxon* in esame.

Sapendo che la biologia riproduttiva di molte entità non è stata studiata e che la raccolta degli alleli comporta la conservazione di un cospicuo numero di campioni, è bene procedere campionando almeno il 50% di individui nel caso di singola popolazione, quando possibile. Questo numero può comunque incrementarsi in funzione della duplicazione di alcuni campioni, del fatto che ci possa essere il sospetto che i semi non siano tutti vitali o in ottime condizioni e per evitare una possibile perdita di materiale durante il trasporto o la quarantena (Brown *et* Marshall, *op. cit.*).

Come regola generale ogni accessione in ingresso nella banca dovrebbe essere costituita quindi da almeno un numero di individui rappresentativi del 50% degli alleli. In ragione di ciò, un lotto di semi raccolto da una singola popolazione dovrebbe possedere le potenzialità per ristabilire la popolazione nella stazione di provenienza oppure in altri siti compatibili con il naturale range ecologico del *taxon* e le caratteristiche genetiche dello stesso.

Raccolta di semi di alberi e arbusti: considerazioni sul mantenimento della variabilità genetica

Le modalità di approvvigionamento del materiale propagativo di specie forestali e arbustive dipendono in larga misura dall'utilizzazione prevista per il materiale stesso. Nel caso dell'arboricoltura da legno, ove gli aspetti produttivi risultano prioritari, sarà il fenotipo degli individui a rivestire la maggiore importanza. Si potrà quindi esercitare una pressione selettiva anche notevole sugli individui destinati alla produzione di semi o altro materiale propagativo (es.: talee), eventualmente allestendo impianti specializzati quali arboreti da seme. Se, al contrario, lo scopo dell'in-

tervento è la selvicoltura naturalistica, o ancor più il ripristino ambientale, risulterà fondamentale disporre di materiale caratterizzato da una elevata variabilità genetica. Questa, infatti, è strettamente correlata con l'adattabilità ed è quindi in grado di migliorare considerevolmente le probabilità di successo dell'intervento, nonché di contribuire a creare popolamenti stabili e di più elevato valore naturalistico.

Perdite di variabilità genetica si possono verificare durante tutte le fasi della filiera che dal popolamento di origine portano al materiale da impiegare nei rimboschimenti: tuttavia i momenti più critici appaiono quelli della raccolta dei semi, della loro lavorazione in stabilimento e della predisposizione dei vivai (Ducci, 2003).

Naturalmente, la variabilità genetica deve essere considerata in funzione delle condizioni ecologiche dell'ambiente nel quale si interviene: l'introduzione di germoplasma da aree lontane, soprattutto se caratterizzate da condizioni pedo-climatiche diverse, potrebbe infatti rivelarsi controproducente, anche se di fatto induce un ampliamento della base genetica. Questa non è stata però sottoposta al vaglio della selezione naturale e più difficilmente potrebbe adattarsi ad un ambiente diverso da quello di origine. Da non sottovalutare nemmeno il possibile effetto di inquinamento genetico, cioè la modificazione del *pool* genico delle popolazioni naturali, risultato di una lunga evoluzione e quindi sicuramente ben adattato alle condizioni locali. Nel caso in cui si effettuino delle attività di forestazione finalizzate alla conservazione *in situ* risulta quindi ineludibile l'impiego di germoplasma autoctono di provenienza locale. Gli aspetti ecologici che rivestono maggiore importanza nel definire l'adattamento di una popolazione sembrano essere, in primo luogo, le caratteristiche climatiche, soprattutto per quanto concerne l'andamento delle temperature. Un ruolo importante viene anche rivestito dagli aspetti topografici quali altitudine e latitudine, mentre il tipo di substrato sembra avere una importanza inferiore (Monteleone *et al.*, 2005a).

Nella realtà dei giorni nostri la situazione appare preoccupante: la certificazione sull'origine dei semi forestali ed arbustivi è prevista solo per le specie più importanti, in tutti gli altri casi si impiega materiale di origine ignota, spesso addirittura importato dall'estero.

Nell'ambito delle specie di interesse forestale il problema può essere risolto ricorrendo alle regioni di provenienza, introdotte dalla Direttiva dell'Unione Europea n. 105/99 e poi riprese dal Decreto Legislativo n. 386 del 2003. Le regioni di provenienza sono “...il territorio o l'insieme di territori soggetti a condizioni ecologiche sufficientemente uniformi e sui quali si trovano soprassuoli o fonti di semi sufficientemente omogenei dal punto di vista fenotipico e, ove valutato, dal punto di vista genotipico, tenendo conto dei limiti altimetrici ove appropriato”.

Resta tuttavia il problema delle modalità pratiche di approvvigionamento del materiale. Oggi spesso non esistono criteri ben codificati e la raccolta si basa quasi esclusivamente su considerazioni di produttività: si privilegiano quindi pochi individui (i più produttivi, oppure quelli più facilmente accessibili) ed il materiale che se ne ottiene presenta di conseguenza una elevata uniformità genetica. Al contrario sarebbe necessario raccogliere materiale da un congruo numero di individui, in modo tale da conservare i più alti livelli possibili della biodiversità presente nel popolamento originario: indicativamente si possono considerare come idonee alla raccolta aree non inferiori a 10 ha e superfici proporzionalmente superiori per specie che si trovano abitualmente allo stato sporadico, quali noce, ciliegio, ciavardello, tiglio, etc. (Ducci *et al.*, 2001).

Gli studi scientifici su tale aspetto sono poco numerosi. Da essi emerge come il numero di genotipi non imparentati da utilizzare per la produzione di seme non dovrebbe essere inferiore a 30, sebbene, nel caso in cui vi siano anche esigenze di salvaguardia *in situ* della biodiversità, tale nume-

ro dovrebbe essere ulteriormente incrementato. Quindi, il campionamento dovrebbe riguardare piante sufficientemente distanziate tra loro e come regola generale non dovrebbe effettuarsi su individui che si trovano a una distanza inferiore ai 100-200 m (FAO, 1995). E' infatti evidente come i processi di disseminazione tendano a far nascere nuovi individui in prossimità della pianta da cui il seme deriva: in molte specie, inoltre, meccanismi naturali di propagazione vegetativa (es.: talee radicali) determinano la presenza di un unico genotipo (clone) tra individui apparentemente diversi (Graudal *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 2003). A risultati analoghi è giunto uno studio congiunto dell'Università di Torino e del Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale (Corpo Forestale dello Stato), il quale ha analizzato le caratteristiche genetiche di un arboreto di pino silvestre costituito a partire dal seme raccolto da 19 piante madri, evidenziando una riduzione della biodiversità sulla base di marcatori biochimici e molecolari sia nel passaggio dal bosco da seme all'arboreto che in quello successivo dall'arboreto al materiale vegetativo da esso ottenuto (Monteleone *et al.*, 2005b). Conclusioni simili sono state ottenute nell'ambito di una analoga ricerca, che ha analizzato un impianto di arboricoltura di farnia della Lombardia per valutarne la potenziale destinazione ad arboreto da seme. Delle due provenienze utilizzate, una ha manifestato consistenti perdite di variabilità genetica rispetto al bosco di origine, mentre la seconda ha conservato livelli sufficientemente elevati: è ipotizzabile che tale differenza sia da imputare al diverso numero di piante portaseme utilizzate per la produzione dell'impianto (Castagna *et al.*, 2005). L'importanza di una raccolta del materiale di moltiplicazione destinato a imboschimenti e rimboschimenti eseguita con buoni criteri (tesi a mantenere variabilità e struttura geografica della diversità genetica), trova conferma nello studio condotto da Burgarella *et al.* (2004) su *Quercus ilex* L. in Andalusia impiegando marcatori molecolari i cui risultati mettono in evidenza la marcata riduzione della variabilità negli impianti costituiti rispetto alla popolazione d'origine.

4.2.2 Scelta degli individui da campionare

La raccolta randomizzata è solitamente la più valida. Può però verificarsi, soprattutto nel caso di entità autoctone, che la popolazione naturale sviluppi delle sotto-popolazioni o delle vere e proprie metapopolazioni. Queste andranno a loro volta individuate e raccolte in maniera randomizzata e trattate come accessioni a sé stanti.

La raccolta casuale implica, inoltre, che ogni singola pianta presente nella popolazione abbia la stessa probabilità di essere inclusa nel campione che tutte le altre (Marshall *et al.*, 1983). Solitamente i raccoglitori prelevano in modo casuale o seguendo delle linee di transetto. Il punto di partenza e la direzione dei transetti nell'area oggetto di studio va effettuata con attenzione al fine di evitare di concentrare il prelievo in uno spazio troppo ravvicinato con individui in stretto rapporto gli uni con gli altri (Brown *et al.*, Marshall, *op. cit.*). Le distanze e, conseguentemente, gli individui da campionare sono funzione della forma biologica della specie pertanto, non può essere utilizzato un criterio o un metodo unico, ma un protocollo specie-specifico.

4.2.3 Numero e tipo di materiale vegetale per pianta

Un altro importante passaggio consiste nell'individuare il metodo e la quantità di materiale da prelevare dal singolo individuo.

La raccolta dei semi e delle spore, a differenza di quella di materiale vegetale di altro genere, si di-

stingue per la sua stretta dipendenza dal fattore tempo. Essa può rivelarsi piuttosto impegnativa, soprattutto nel caso di entità ancora poco conosciute e comportare diverse uscite sul terreno prima di procedere al prelievo dei frutti e/o dei semi o spore al giusto stadio di maturazione (Brown *et* Marshall, *op. cit.*).

La raccolta di altro materiale vegetale è soggetta meno pesantemente al vincolo del tempo. La raccolta di bulbi, rizomi o di parti aeree può essere condotta senza rigidi limiti temporali, operando sul terreno, preferibilmente durante i mesi di riposo vegetativo.

La quantità di germoplasma da prelevare è funzione sempre del grado di minaccia cui è soggetta la entità o della sua vulnerabilità e rarità. Nel caso di raccolta di semi o spore, il prelievo deve essere adattato alla disponibilità di germoplasma prodotto dal popolamento nella stagione in corso. La pressione esercitata dalla raccolta va calibrata di volta in volta e adattata all'evoluzione o involuzione del popolamento. Per questo la raccolta deve attenersi ad un protocollo indicativo e considerare, tra le diverse opzioni, anche la possibilità di non procedere al campionamento o, al contrario, di raccogliere tutto il germoplasma a disposizione.

Anche la raccolta del materiale vegetale per altri fini, ad esempio per analisi biologico-molecolari, deve essere effettuata nei limiti indicati dal protocollo in uso e accettabili per la conservazione *in situ* e le attività di ricerca *ex situ*.

Normalmente nelle raccolte di seme destinate alla produzione di semenzali, oppure alla conservazione *ex situ*, non si tengono i lotti separati per individuo, perciò per evitare di favorire la presenza di determinati genotipi (es.: più produttivi, quelli collocati in luoghi raggiungibili, etc.), si dovrebbe raccogliere una analoga quantità di semi per ogni individuo.

4.2.4 Considerazioni da tenere presenti durante la raccolta

- Come regola generale non raccogliere mai più del 20% dei semi disponibili il giorno in cui si è in campo. Questo assicura che il popolamento non venga danneggiato da una raccolta eccessiva. L'unica eccezione a questa regola è data da situazioni particolari, quali ad esempio la sicura ed imminente distruzione della popolazione.
- Per i *taxa* particolarmente rari e/o minacciati, qualora sia disponibile materiale *ex situ*, al massimo di prima generazione (F1) esente da fenomeni di ibridazione, è possibile impiegarlo per l'esecuzione delle prove di germinazione necessarie all'individuazione di protocolli efficaci (germinazione e propagazione) e conservare, invece, tutto il germoplasma raccolto *in situ*, moltiplicandolo una volta definiti i protocolli.
- Una entità trovata solo in un ristretto ambito geografico, merita di essere campionata in più punti, con un incremento del numero di individui per ogni sito e un incremento del numero dei propaguli per ogni individuo. Lo stesso vale per i *taxa* molto rari di cui è impossibile campionare un numero elevato di individui; in questo caso si procede con la raccolta in più stazioni, prelevando un maggior quantitativo di germoplasma dalla singola pianta.
- Le entità che crescono in un ampio spettro di situazioni ecologiche divergono più facilmente dal punto di vista genetico. In questi casi è bene incrementare il numero delle popolazioni o delle sotto-popolazioni da campionare, tenendo distinte le une dalle altre.
- Le popolazioni di entità perenni possono essere costituite da individui di diversa età e che possiedono una struttura dipendente appunto dall'età del popolamento. In questo caso gli individui dovrebbero essere campionati casualmente senza tener conto della taglia o dell'età per massimizzare la diversità genetica esistente.

- Se l'entità è rigenerabile anche vegetativamente, può risultare utile raccogliere oltre ai semi le altre parti necessarie alla sua perpetuazione. Tale tipo di rigenerazione andrebbe privilegiata quando il *taxon* è in grave pericolo di estinzione.
- Le entità sincrone dal punto di vista fenologico possono essere oggetto di raccolta simultanea, a seguito di una precisa pianificazione delle missioni sul terreno. D'altro canto, quando l'epoca di fioritura è scaglionata su un periodo di tempo lungo, non tutti gli individui al momento della raccolta possono avere i semi nelle stesse condizioni di maturazione. La variabilità genetica del popolamento può essere quindi influenzata da fattori stazionali diversi ed è pertanto importante raccogliere campioni da più piante che si trovano in diverse condizioni ambientali ed ecologiche.
- E' necessario incrementare la raccolta nelle entità che manifestano un elevato polimorfismo. Popolazioni di specie autogame possono avere delle sotto-popolazioni che giustificano una raccolta randomizzata.
- Nel caso di impollinazione anemofila tenere presente che ogni pianta portante diversi fiori può essere impollinata da pollini di provenienza diversa. Nel caso di impollinazione zoofila la fonte del polline può invece essere anche la stessa per diversi fiori (Brown *et* Marshall, *op. cit.*).

Un'attenzione particolare va rivolta alle popolazioni isolate e a quelle di margine, perché possono presentare varianti alleliche rare. Nelle zone di contatto tra subspecie si possono riscontrare maggiori variazioni genetiche e morfologiche. Questo è ovviamente il risultato dell'ibridazione e della segregazione. I differenti morfotipi vanno tenuti separati per quanto possibile. I raccoglitori devono pertanto prestare particolare attenzione alle aree e ai siti dove ci possono essere transizioni di *taxa*. È fondamentale che i raccoglitori indichino ogni possibile cambiamento nella frequenza e nell'estensione geografica delle entità e ipotizzino le ragioni per cui tale processo si è verificato (Von Bothmer *et* Seberg, 1995).

Riassumendo:

- Campionare, quando possibile, non meno di 10 popolazioni per area ecogeografica omogenea.
- Campionare, se fattibile, circa il 50 % di individui per ogni popolazione.
- Campionare in maniera casuale, ma tenendo distinte le metapopolazioni se l'habitat risulta eterogeneo.
- Campionare sufficienti semi o materiale vegetale per ogni pianta al fine di assicurarne una rappresentatività soddisfacente.
- Randomizzare la raccolta sulla superficie in esame e indicare sulla scheda di campo la metodologia seguita (raccolta centrale, linea diagonale, di margine, etc.).
- Tenere presenti i diversi parametri stazionali (altitudine, esposizione, suolo, pendenza, ombreggiamento) per diversificare, quanto più possibile, il campione.
- Individuare le fasi fenologiche coincidenti con le visite preliminari alla stazione di raccolta e con il momento del prelievo, indicandole sull'apposita scheda. Queste informazioni consentiranno di realizzare un calendario fenologico, di monitorare le variazioni nel ciclo vegetativo anno dopo anno e di risparmiare tempo nelle successive campagne di raccolta.
- Specificare sulla scheda le perplessità e i dubbi emersi durante il campionamento.

4.3 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.

Ad esempio in *Pastinaca sativa* L. le ombrelle primarie maturano circa 10-14 giorni prima delle ombrelle secondarie, che maturano a loro volta 10-14 giorni prima delle terziarie. Per l'intera popolazione i semi sono dispersi naturalmente in un periodo di tempo compreso tra agosto e ottobre (Hendrix, 1984).

Anche l'osservazione dell'impollinazione può fornire importanti spunti su come procedere nella raccolta: l'impollinazione con polline proveniente da differenti donatori può portare ad una diversa maturazione dei frutti prodotti, mentre negli ovuli di piante fecondate in anticipo è più facile che si sviluppino semi piuttosto che in piante fertilizzate tardivamente (Lee, 1988).

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" (v. 6.9.1)

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.

Le modalità di raccolta dei semi possono influenzare i risultati dei test di germinazione condotti in laboratorio e influire sulla capacità di superare eventuali dormienze. E' stato dimostrato che per alcune specie tali variazioni possono dipendere dalla posizione che i semi hanno all'interno dei frutti (es.: semi basali più dormienti di quelli apicali) o dalla loro distribuzione sulla pianta (Toole *et al.*, 1964). Anche il peso e le dimensioni dei semi possono influire sulla qualità del lotto e sulla sua risposta ai test di vitalità. Alcune *Poaceae* sviluppano due tipi morfologici di semi: quelli grossi danno piante più vigorose e con capacità germinativa maggiore rispetto a quelli piccoli (Lahiri *et al.*, 1961).

4.3.1 Individuazione del momento ideale per la raccolta

In molti casi i semi non possono essere raccolti singolarmente e devono essere prelevati insieme ai frutti (fig. 7-9) che li contengono. In questo modo si eviterà di interrompere il processo di maturazione fisiologica ancora in corso e verrà favorita l'acquisizione, per i semi, della tolleranza alla deidratazione. Sapendo che i semi prodotti da frutti non carnosì indeiscenti e deiscenti sono, nei primi stadi di sviluppo, intolleranti alla deidratazione, la raccolta va effettuata in una fase successiva, quando il seme è divenuto igroscopico e quindi tollerante alla deidratazione. Individuare questo momento non è facile. Quando l'esperienza non è di aiuto, alcuni indizi sul frutto (carnoso o non carnosì) possono aiutare e fornire spunti su come procedere:

- Il cambiamento di colore può essere un buon indice, ma non sempre è affidabile. Nel pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ad esempio, bacche di colore diverso (dal verde al rosso) possono contenere semi allo stesso grado di maturazione (Ellis *et al.*, 1981).
- La taglia del frutto nelle drupe è correlata al completo sviluppo dei suoi semi (Smith, 1995).
- L'indurimento del pericarpo in certi frutti si manifesta solo dopo che lo sviluppo dell'embrione è stato completato.



Figura 7 – Frutti di *Astragalus verrucosus* Moris in fase di maturazione. (foto: E. Mattana)



Figura 8 – Semi di *Helicodiceros muscivorus* (L.f.) Engl. (foto: L. Podda)



Figura 9 – Galbuli di *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Neill. Per una loro corretta conservazione i semi devono essere estratti dai galbuli al loro ingresso in banca. (foto: G. Bacchetta)

I frutti carnosi vanno raccolti allo stadio di maturazione ottimale. La raccolta anticipata, infatti, può fornire materiale a bassa germinabilità. La raccolta tardiva, invece, può causare perdite dovute alla dispersione naturale, alla predazione da parte di animali ed a fenomeni meteorologici quali grandinate o piogge intense.

4.3.2 Prova del taglio

Dopo aver individuato la popolazione da campionare, il raccoglitore dovrebbe esaminare attentamente un primo campione di semi usando la “prova del taglio” (fig. 10) e, per i semi molto piccoli, una lente. Questa semplice analisi preliminare permette di stimare con buona approssimazione la qualità del materiale, la frequenza dei semi vuoti o danneggiati e l’opportunità della raccolta.

La prova del taglio è un metodo rapido che può essere effettuato direttamente al momento della raccolta. Il test consiste, avvalendosi di una lametta o di un bisturi, nel taglio del seme a metà: i semi di elevata qualità mostrano tessuti turgidi, sani, con colore tipico per ogni specie (generalmente bianco o avorio) e senza danni da patogeni o insetti. Nel caso di lotti di mediocre qualità si tende spesso a sovrastimare il numero dei semi sani (Suszka *et al.*, 1994).

Le difficoltà legate a questa analisi preliminare possono insorgere nel caso di scarsa esperienza dell'operatore, oppure quando si opera con semi molto piccoli (Piotto *et al.*, 2001). In questa situazione, e se anche la lente non rappresenta un valido aiuto, si può procedere alla raccolta utilizzando bustine traspiranti e delegando l'indagine della qualità del seme alla banca, dove il test può essere eseguito esaminando tre repliche da 30 semi ciascuna (Crosti *et al.*, 2006).

4.3.3 Protocollo di raccolta

Se ci sono sufficienti semi atti alla raccolta, può essere seguito il seguente protocollo:

- Conservare i semi maturi e asciutti in sacchetti di carta o di cotone.
- Conservare i semi interi, contenuti ancora nei frutti, in buste di carta.
- Conservare i frutti carnosi direttamente in sacchetti di plastica e favorirne l'aerazione: possono decomporsi rapidamente ed una cattiva conservazione può pregiudicare la vitalità dei loro semi. In generale la pulizia dei semi dovrebbe essere lasciata allo staff della banca.
- Prelevare un campione d'erbario per una sicura determinazione.
- Per le entità molto rare e/o minacciate, ripetere la raccolta in due anni successivi, per avere la sicurezza di raccogliere materiale idoneo, oppure più campionamenti in uno stesso anno, senza riprendere il campione d'erbario.
- 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, contro la possibile sparizione della popolazione e come fonte per studi sulla genetica e la biologia della specie, anche attraverso analisi quantitative e qualitative non distruttive;
 - 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;
 - una parte della collezione possa essere destinata alla produzione di lotti per la duplicazione delle collezioni e per la validazione dei protocolli di germinazione da parte di altre banche e/o centri di ricerca.

Nel caso in cui si preveda che la raccolta possa influenzare negativamente l'andamento demografico di una specie o di una singola popolazione, già gravemente minacciata, questa non deve essere effettuata. Devono conseguentemente essere privilegiati altri metodi di moltiplicazione, compatibilmente con la forma biologica del *taxon* (es.: moltiplicazione *in vitro*, realizzazione di talee o rigenerazione attraverso moltiplicazione di germoplasma già presente in altre banche).

4.3.4 Procedura tipo per la raccolta dei semi

A seguire vengono specificate le procedure relative alla compilazione della scheda di raccolta del germoplasma, così come evidenziate nell'allegato (v. 13.1):



Figura 10 – Prova del taglio in un seme di *Pancratium maritimum* L. (foto: E. Mattana)

-
- identificare il *taxon*;
 - se non si è sicuri della sua natura, avvalersi di flore da campo per la determinazione (in tal caso indicare nella scheda di raccolta il testo che si è utilizzato); nel caso non sia possibile determinare con sicurezza il *taxon*, indicare nella scheda la voce “necessaria rigenerazione per determinazione”;
 - delimitare la stazione;
 - nel caso la stazione abbia dimensioni misurabili, verificarne i limiti, l’estensione e la presenza di eventuali microstazioni, riportando tutti i dati stazionali nella scheda di raccolta; è importante evidenziare, oltre alle informazioni di carattere geografico, la proprietà e le eventuali tipologie di protezione presenti;
 - raccogliere il materiale;
 - indicare nella scheda il numero di individui sui quali è stata effettuata la raccolta ed il quantitativo di materiale prelevato per individuo, oltre alla tipologia di campionamento;
 - terminare la compilazione della scheda annotando qualsiasi specifica utile alla banca;
 - registrare il prelievo del campione d’erbario.

4.4 Raccolta di dati e informazioni in campo: compilazione delle schede

La caratterizzazione di 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*. Per quanto riguarda la conservazione *ex situ*, i risultati derivati da studi di struttura e dinamica di popolazioni, uniti alla conoscenza dell’attuale distribuzione di un *taxon* (compreso il pattern di variabilità genetica e la biologia riproduttiva), consentono campionamenti più efficaci e più rappresentativi del pool genetico del *taxon* che si intende conservare.

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 (v. 13). Ogni qualvolta viene eseguita una indagine specifica, deve essere compilata la scheda relativa.

Ciascuna scheda ha una prima parte relativa ai dati stazionali e una seconda specifica per ogni tipo di studio. La ripetizione dei dati stazionali per le singole accessioni consente di ottenere una sempre maggiore accuratezza degli stessi e la possibilità di osservare, nel tempo, l’eventuale variazione dei parametri ambientali (es.: range altimetrico, superficie, etc.).

La disponibilità di questi dati è fondamentale nell’elaborazione di protocolli di germinazione di *taxa* endemici o dei quali non esistono dati o algoritmi pubblicati.

4.4.1 Equipaggiamento per la raccolta del germoplasma e dei dati

Le attrezzature ed i materiali necessari per le attività di campo (fig. 11) sono in gran parte assimilabili a quelli normalmente utilizzati in altre ricerche di tipo sperimentale e per tutte le pratiche sportive 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:

-
- quaderno di campo
 - registratore vocale
 - schede di campo
 - PC palmare - 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 (es.: Flora d'Italia, Pignatti 1982) e manuali di campagna (es.: Flora dels Països Catalans, Bolòs 1984-1997)
 - altimetro/barometro
 - termometro
 - igrometro
 - clinometro
 - pHmetro
 - GPS o dGPS
 - guanti da giardiniere o in lattice e mascherine
 - lenti d'ingrandimento a 3x o 6x
 - lamette/bisturi
 - vetrini portaoggetti
 - coltellino/forbici da potare
 - trivella/piccozza/paletta/piccone
 - attrezzatura da arrampicata (caschi, corde, imbraghi, discensori, moschettoni, etc.)
 - matite/penne/gomme
 - fotocamera reflex o compatta
 - binocoli
 - fogli di giornale/tamponi/presa da campo
 - vasi in plastica
 - gel di silice per conservare il materiale per gli studi di biologia molecolare

4.5 Procedure da seguire in casi particolari

4.5.1 Mancata raccolta del germoplasma

Compilare comunque la scheda di raccolta nelle voci fondamentali, motivando le ragioni del mancato prelievo e indicando come supplire a tale mancanza (definire nuova data di raccolta, scegliere un'altra stazione, raccogliere altro tipo di germoplasma, etc.). Nel caso in cui vengano effettuati altri tipi di rilievi, compilare le apposite schede (scheda fenologica, demografica, rilievo floristico-sociologico, rilievo pedologico, etc.) e allegarle alla scheda di raccolta da consegnare alla banca.

Nel caso di impossibilità di raccolta ripetuta (condizioni meteo sfavorevoli, condizioni fitosanitarie precarie, mancanza di germoplasma, etc.), si potrà procedere col prelievo di un campione di suolo raccolto nei pressi di uno degli esemplari (v. 4.5.6) o, nel caso di infestazione da parte di un agente patogeno, di un campione completo della pianta. Tale materiale va conservato dentro sacchetti di nylon con etichetta di riconoscimento.



Figura 11 – Un momento della raccolta delle nucule di *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi et Bacch. (foto: C. Pontecorvo)

4.5.2 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, 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, come nel caso, ad esempio, di *Centranthus amazonum* Fridlender et A. Raynal e *Ribes sardoum* Martelli, presenti esclusivamente ad Oliena (NU), in località Sos Prados.

4.5.3 Danni biotici al popolamento

Lo spirito di osservazione del raccoglitore è un elemento importante nell'individuare fattori di disturbo o minacce al sito ed alla entità in questione. Egli dovrebbe in ogni occasione verificare le condizioni generali della specie e degli individui dai quali viene prelevato il germoplasma.

In caso di infestazione da parte di insetti, funghi o altri agenti patogeni, si rende necessario il prelievo di un campione dell'ospite e del patogeno, avendo cura di conservarlo in busta chiusa ben sigillata, tenuta separata da altro materiale sano che potrebbe subire contaminazioni. Tale materiale può essere anche conservato in provette di vetro con formaldeide al 30% o alcool denaturato e glicerina in proporzioni di 1:1.

4.5.4 Condizioni meteorologiche sfavorevoli

Quando le condizioni meteorologiche sono sfavorevoli (es.: pioggia, grandine, neve) non si dovrebbe procedere alla raccolta; in caso di pioggia nei giorni precedenti l'uscita, si può procedere al campionamento valutando attentamente la condizione dei semi ed in particolare se questi sono già stati dispersi, se sono molto umidi o danneggiati. Qualora il materiale risulti atto alla raccolta, sarà utile procedere alla stessa avendo cura di far asciugare il germoplasma all'aria e non al sole, consegnandolo al più presto alla banca.

4.5.5. Necessità di raccogliere campioni d'erbario e/o piante in vivo

Nel caso in cui non sia già presente in erbario un campione della popolazione, è necessario provvedere alla sua raccolta. I campioni d'erbario dovrebbero riportare lo stesso numero di riferimento della corrispondente collezione di semi ed idealmente dovrebbero essere completi (fig. 12) e includere fiori, frutti, parti vegetative e radici (per le piante erbacee). Per la realizzazione di un buon campione d'erbario si suggerisce, durante escursioni lunghe, di completare l'essiccamento della pianta nel più breve tempo possibile, utilizzando della carta assorbente (carta di quotidiani) o dei fogli di gommapiuma e delle presse portatili. Quando ciò non è possibile, i campioni vanno tenuti in luoghi asciutti, cambiando frequentemente la carta. Nell'impossibilità di procedere all'essiccazione, si consiglia di pressare ugualmente il materiale d'erbario e di conservarlo in sacchi di plastica, avendo cura di cospargere i campioni con alcool denaturato prima di sigillare i pacchi. Tale procedura viene comunemente adottata durante le spedizioni e le campagne di raccolta in luoghi caldi ed umidi, specie in area tropicale dove i processi fermentativi rischierebbero di comprometterne la conservazione. I campioni d'erbario non saranno raccolti per entità effettivamente molto rare o minacciate, soprattutto se ben note dal punto di vista tassonomico. Un ulteriore strumento per lo studio, la conservazione e la moltiplicazione del germoplasma di un *taxon* è la raccolta di piante in vivo da conservare in vaso o in vivaio. Tale raccolta va effettuata solo da personale specializzato quando il prelievo non pregiudica o riduce il potenziale biotico del *taxon* all'interno del singolo popolamento; risulta di grande utilità quando non si conosce la biologia riproduttiva e la fenologia della specie, o quando il campione consente la moltiplicazione per via vegetativa.

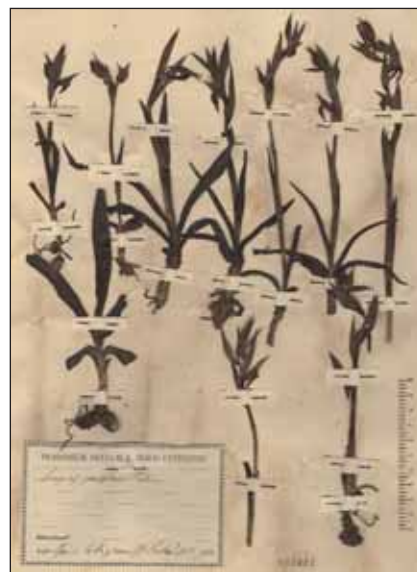


Figura 12 – Scansione di un campione d'erbario di *Serapias parviflora* Parl. (collezione Tornabene) disponibile in internet sulle pagine web del Dipartimento di Botanica di Catania.

4.5.6 Raccolta di campioni di suolo

In qualche occasione risulta importante prelevare, contestualmente alla compilazione di apposite schede, uno o più campioni di suolo. Sul campione potranno essere realizzate tutte le analisi fisico-chimiche necessarie per la sua caratterizzazione. Le informazioni sul suolo concorrono a una migliore definizione dell'ecologia di una determinata unità tassonomica.

Per ottenere una caratterizzazione completa verrà determinata la composizione tessiturale, il pH in acqua, il pH in cloruro di potassio (KCl), i carbonati, la sostanza organica, il carbonio organico, l'azoto totale, il fosforo assimilabile, i pF (4,2 e 2,5), l'acidità complessiva, le basi di scambio, la saturazione in basi e la capacità di scambio cationico.

Una volta ottenuti tali dati, sarà possibile procedere alla classificazione dei suoli secondo la Soil Taxonomy (Soil Survey Staff, 1998).

Di grande importanza per gli studi di carattere ecologico sono le analisi atte a determinare la banca di semi del suolo per individuare l'abbondanza e la persistenza dei semi nel terreno (v. 10.7).

4.6 Raccolta del polline

4.6.1 Introduzione

Il polline è un organismo aploide, si sviluppa dentro le cavità dell'antera dette loculi, che sono circondati da un tessuto effimero, il tappeto, che ha la funzione di nutrire e regolare lo sviluppo dei granuli (Pacini, 1997). Quando i granuli sono fisiologicamente maturi l'antera si apre per esporre il polline agli agenti disperdenti. Questo processo di apertura è anticipato da una parziale perdita di acqua da parte dell'antera, inoltre anche i granuli prima, durante o dopo l'apertura possono perdere acqua (Pacini, 2000).

Al momento dell'apertura dell'antera il polline può essere:

- espulso dall'antera, come in alcune piante anemofile (es.: *Morus*, *Parietaria*) e in certe entomofile come alcune specie del genere *Genista*;
- disperso non appena l'antera si apre, perché non ci sono meccanismi che lo trattengono, come avviene in molte piante anemofile (es.: *Poaceae*);
- trattenuto nell'antera dal pollenkitt, una sostanza viscosa derivata dalla degenerazione del tappeto dell'antera (Pacini *et* Hesse, 2005), finché la forza di adesione del polline all'antera non è vinta dal vento, o perché il polline è caricato incidentalmente dagli animali che visitano i fiori.

In tutti e tre i casi il polline dal momento dell'apertura dell'antera è sempre sottoposto ad oscillazioni di temperatura e di umidità relativa. Se i granuli non hanno dei meccanismi per sopravvivere a questi stress possono perdere o acquisire acqua, essere invasi da muffe e batteri, soprattutto quando l'umidità relativa è alta, e eventualmente morire più o meno velocemente.

Il tempo e lo spazio che intercorrono tra l'apertura dell'antera e l'arrivo del polline sui siti di atterraggio sullo stigma nelle *Angiospermae* o sulla goccia micropilare nelle *Gymnospermae*, possono oscillare ampiamente. Può essere di pochi secondi e pochi centimetri nelle piante sociali annuali come le *Poaceae*; di pochi giorni e di alcuni chilometri, come succede in molti alberi anemofili come le conifere; di pochi giorni ma senza grandi spostamenti, come può accadere in alcune piante entomofile che sono presenti in basso numero per unità di superficie (es.: *Orchidaceae*).

4.6.2 Categorie di granuli di polline

Al momento dell'apertura dell'antera si possono distinguere i granuli di polline a seconda di varie caratteristiche quali: dimensioni, forma, struttura, stadio di sviluppo, contenuto in acqua, maniera di aggregazione.

Le dimensioni dei granuli possono oscillare tra 30 e 200 micron, con moltissime specie che hanno granuli di 60–80 micron.

La forma dei granuli è comunemente ovale, qualche volta sferica, solo raramente si hanno altre forme, come in molte monocotiledoni marine; in *Posidonia oceanica* (L.) Delile è aghiforme, lungo pochi millimetri e largo poche decine di micron.

La struttura esterna e interna del granulo di polline è importante per il suo riconoscimento. Avendo due pareti di differente composizione, esina e intina, queste determinano la geometria del granulo e sono importanti caratteri per riconoscerlo. Inoltre, anche la presenza o assenza di amido al suo interno è spesso un carattere sistematico (Franchi *et al.*, 1996). Infatti durante lo sviluppo si ha sempre l'accumulo di amido, ma nel polline maturo questo può essere totalmente o parzialmente idrolizzato

(Pacini, 1996). Se è assente non significa che non esistono dei carboidrati di riserva, questi però sono localizzati all'interno di vescicole citoplasmatiche invece che negli amiloplasti (Franchi *et al.*, 1996). Nel granulo maturo esistono anche delle riserve solubili di carboidrati, soprattutto glucosio, fruttosio e saccarosio (Speranza *et al.*, 1997). Il granulo di polline, a seconda del gruppo sistematico a cui appartiene, può avere completato il suo sviluppo prima della dispersione, oppure questo avviene durante la crescita del tubetto pollinico. I granuli si distinguono in: trinucleati e binucleati; i primi sono quelli che hanno completato il loro sviluppo, cioè sono composti da due gameti maschili e una cellula del tubetto; i binucleati, invece, devono ancora differenziare i gameti maschili previa una divisione mitotica. Recentemente è stato individuato che, in analogia con quanto avviene nei semi, ci sono due categorie di granuli: quelli parzialmente disidratati, analoghi ai semi ortodossi, e quelli parzialmente idratati, analoghi a quelli recalcitranti (Franchi *et al.*, 2002; Nepi *et al.*, 2001; Pacini *et Hesse*, 2004; Pacini *et al.*, 2006). Anche in questo caso, come nei semi, il discriminante tra le due categorie è il 30% di acqua presente nel polline. I granuli che in natura diventano parzialmente disidratati, con un contenuto di acqua inferiore al 30% resistono bene agli stress di temperatura, umidità relativa e sono facilmente conservabili; essi però germinano sullo stigma più lentamente, cioè impiegano un tempo sempre superiore ad un'ora. I granuli con un contenuto di acqua superiore al 30%, non sopportano la deidratazione, però germinano velocemente, anche dopo pochi minuti, perché la fase di reidratazione è brevissima.

Quando l'antera si apre i granuli possono presentarsi per la dispersione in differenti maniere, che dipendono dal tipo di meccanismo che li tiene insieme a formare masserelle. Con il termine "unità disperdente del polline" si intende la configurazione con cui il polline viene disperso. Infatti, i granuli possono essere dispersi individualmente, come avviene in moltissime piante anemofile, oppure raggruppati. I quattro granuli di polline che derivano da una meiosi possono separarsi, oppure rimanere insieme a formare una tetrade, perché hanno delle pareti in comune.

Tredici differenti tipi di unità disperdenti del polline sono stati individuati da Pacini *et Franchi* (1998). I granuli di polline in monadi o in tetradi possono essere dispersi in unità disperdenti più complesse perché tenuti insieme da sostanze viscosi come il pollenkitt o filamenti adesivi. Tutto questo porta al fatto che i granuli di polline possono arrivare sullo stigma da soli o insieme, in masse anche di alcune centinaia di migliaia, come nelle *Orchidaceae*.

Da un punto di vista genetico ne consegue che maggiore è il numero di granuli che compongono una unità disperdente che arriva sullo stigma, più alto sarà il numero dei semi di un frutto che hanno lo stesso padre. Viceversa, se il polline è disperso individualmente, è più facile che sullo stigma arrivino dei granuli provenienti da piante differenti, cioè da padri differenti; in questo caso ci sarà una forte competizione maschile (selezione gametofitica).

Tutte queste caratteristiche sono importanti, direttamente o indirettamente, per le modalità di raccolta del polline ed anche per la sua successiva conservazione.

4.6.3 Perché si raccoglie il polline

Il polline viene raccolto per scopi di ricerca o applicativi (Hoekstra, 1995; Dafni *et al.*, 2004); a seconda delle motivazioni per cui viene raccolto, le modalità e le quantità di polline possono variare in funzione di una o più delle ragioni di seguito elencate:

- per conoscere la forma e il tipo di unità disperdente;
- per verificare il suo stato di idratazione, cioè per stabilire se è parzialmente idratato o disidratato e quindi valutarne la possibilità e i metodi di conservazione;

- per controllare se è vitale, cioè per vedere se atto alla fecondazione;
- per vedere se è formato da due o tre cellule, cioè per valutarne lo stadio di sviluppo;
- per immagazzinarlo e usarlo poi per ricerche di biologia vegetale;
- per la sperimentazione e terapia nel campo delle allergie da polline;
- per immagazzinarlo e poi impollinare piante di interesse economico, come avviene per il kiwi dove i frutti impollinati abbondantemente sono più grandi e sul mercato spuntano un prezzo più alto;
- per conservare il germoplasma di una determinata specie.

4.6.4 Controllo della vitalità

Qualunque sia la ragione per cui si raccoglie il polline, in analogia con quello che si fa per il seme, è bene conoscere la sua vitalità, cioè se possiede la capacità di fecondare. Questa caratteristica è importante all'apertura dell'antera, ma anche al momento della raccolta e nelle eventuali fasi successive. Se si tratta di un polline parzialmente idratato, quindi particolarmente vulnerabile, sarebbe bene capire per quanto tempo rimane vitale quando viene sottoposto a condizioni di bassa umidità. Esistono essenzialmente cinque approcci per valutare se il polline è vitale; a questo scopo vengono usate differenti metodologie che forniscono risultati indiretti o diretti. I risultati indiretti sono quelli in cui si hanno dei dati che ci inducono a pensare che il polline sia o meno vitale. I risultati diretti sono quelli che derivano dalla misurazione dell'attività fecondante.

Questi approcci/modalità sono qui di seguito riportati:

- viene analizzato il polline per verificare la presenza e abbondanza di molecole che sono coinvolte nel processo respiratorio, dalla loro presenza si arguisce che il polline è vivo;
- viene colorato il citoplasma o alcune molecole generiche che indicano la sua presenza o attività metabolica; queste caratteristiche però non ci assicurano che il polline sia effettivamente vivo;
- il polline viene fatto germinare in vitro, su mezzi solidi o liquidi. Se i granuli sono capaci di emettere i tubetti significa che sono vivi;
- il polline viene usato per impollinare e viene osservata l'allegagione dei frutti ed il numero di semi che arrivano a maturazione.

Quest'ultimo metodo è il più affidabile però richiede settimane, talvolta anche mesi. Gli altri metodi, invece, permettono di avere dei risultati in poche ore, in alcuni casi anche minuti.

Il metodo indiretto più usato è però quello della reazione fluorocromatica (Heslop-Harrison *et al.*, 1984). Tale metodica prevede l'utilizzo del colorante apolare "diacetato di fluoresceina" in grado di penetrare all'interno dei granuli di polline. Nel loro citoplasma la presenza di determinate attività enzimatiche (esterasi) permette la liberazione della fluoresceina, un composto polare fluorescente che permane all'interno del granulo solo se la membrana plasmatica è intatta. Quindi questa metodica evidenzia la presenza di enzimi attivi e l'integrità della membrana plasmatica. Se osservati mediante un microscopio dotato di luce UV i granuli vitali, che hanno accumulato al loro interno la fluoresceina, appaiono intensamente fluorescenti, mentre quelli morti hanno una fluorescenza debole o assente. Per avere dei dati attendibili è sempre bene osservare almeno un centinaio di granuli per preparato e fare almeno tre repliche per procedere all'analisi statistica.

Con questo metodo si può valutare la vitalità di un campione in meno di un'ora, purché si abbia a disposizione un microscopio a fluorescenza. In caso contrario, disponendo solo di un semplice microscopio ottico con luce visibile, è possibile utilizzare altri metodi indiretti che evidenziano attività enzimatiche come le deidrogenasi e le perossidasi che sono altrettanto semplici e rapidi, ma che possono dare dei falsi positivi (Dafni *et al.*, 2004). Un altro metodo indiretto che utilizza il microscopio

a luce visibile è quello di Pálfi *et* Mihalik (1985) che mediante un colorante specifico mette in evidenza la prolina, un aminoacido sempre presente nelle cellule vitali.

Non tutti i granuli di polline mantengono nel tempo la loro vitalità, molto dipende dal contenuto di acqua e di carboidrati (Pacini *et al.*, 2006). Quelli parzialmente disidratati normalmente la conservano più a lungo perché sono capaci di far variare la pressione di turgore interna al mutare delle condizioni esterne. Il meccanismo coinvolto in questo tipo di omeostasi è la polimerizzazione e depolimerizzazione di saccarosio, glucosio, fruttosio ed amido. Quando la temperatura si innalza si ha una depolimerizzazione del saccarosio e dell'amido, aumenta la pressione di turgore e l'acqua dei colloidali del citoplasma non evapora. Anche quando la temperatura si avvicina allo zero si ha un aumento della pressione di turgore, solo che questa serve ad impedire la formazione di cristalli di ghiaccio. Lo stesso aumento della pressione di turgore si ha anche quando l'umidità relativa diminuisce molto e si evita l'evaporazione. Viceversa quando l'umidità relativa è molto alta, anche superiore al 90%, la pressione di turgore diminuisce per la polimerizzazione di glucosio e fruttosio a saccarosio, ed anche per la formazione di amido dal glucosio (Vesprini *et al.*, 2002; Pacini *et* Hesse, 2005).

I granuli di polline parzialmente idratati sono normalmente sprovvisti di meccanismi omeostatici per cui molti perdono acqua, diminuiscono di volume e muoiono a poche ore dall'apertura dell'antera, soprattutto se conservati in ambienti secchi. Questo è stato messo in evidenza con differenti metodi su *Cucurbita pepo* L., la cui presentazione del polline agli agenti disperdenti dura solo sei ore (Nepi *et* Pacini 1993). Le *Poaceae* hanno granuli di polline parzialmente idratati ed è molto difficile conservarli a lungo. Naturalmente la loro vitalità si prolunga un po' se vengono conservati ad alta umidità relativa (Pacini *et al.*, 1997). Barnabas *et* Rajki (1981) hanno messo a punto un metodo per conservare a lungo i granuli di polline di mais facendo diminuire molto lentamente il loro contenuto di acqua. Tale metodo tuttavia non è comunemente usato.

4.6.5 Metodi di raccolta

Dato che il polline può lasciare l'antera non appena questa si apre, oppure rimanervi, le modalità con cui raccoglierlo sono differenti. Bisogna tenere presente dopo quanto tempo si deve effettuare la raccolta dei granuli dal momento dell'apertura dell'antera. Individuare quindi il tempo 0, dopo di che alcune caratteristiche dei granuli possono cambiare a seconda delle condizioni esterne, soprattutto per i granuli di polline che sono parzialmente idratati (Pacini, 2000).

Il polline, quando viene lasciato cadere dalle antere, viene raccolto su dei fogli di carta paraffinata. Se si tratta di piante che espellono il polline dall'antera, o se questo esce non appena l'antera si apre, si prendono delle piante o delle porzioni di pianta con fiori o infiorescenze maschili, il più prossime alla deiscenza dell'antera, e si mettono in un vaso al centro di un foglio di carta paraffinata, cercando di orientarle tutte all'esterno del vaso. Questa operazione è bene farla la sera. La mattina dopo, se la carta non si trova in un luogo dove penetra la luce del sole, è meglio illuminare il vaso con i fiori mediante una lampada in modo da facilitare l'aumento della temperatura e l'apertura dell'antera. E' bene raccogliere il polline giorno per giorno e ripetere l'operazione ogni sera. La raccolta va fatta in un ambiente privo di correnti d'aria e di contaminanti aerodispersi.

Lo stesso metodo può essere usato nel caso in cui le antere trattengono il polline ad esempio per la presenza di cemento pollinico (pollenkitt), comunque si hanno buoni risultati se i fiori recisi, come nelle *Asteraceae*, sono messi capovolti sulla carta. Anche in questo caso è bene non lasciare i fiori da cui si raccoglie il polline per più di un giorno, in quanto si può provocare la liberazione del polline non ancora maturo dalle antere.

In alcuni casi si possono anche raccogliere le antere tagliando i filamenti, specialmente se sono lunghi, lasciarle un po' di tempo in atmosfera secca che facilita l'apertura delle stesse, e poi passare queste al setaccio con maglie di poco più grandi del diametro del polline. In questo caso la resa, soprattutto se i granuli sono circondati da pollenkitt, è molto bassa, inoltre se le maglie sono troppo grandi possono passare anche dei peli e dei residui dell'antera.

Un metodo che sta dando dei buoni risultati è quello di usare una piccola pompa aspirante per raccogliere i granuli risucchiandoli direttamente dall'antera non appena aperta. In questo caso i granuli vengono raccolti dentro una provetta che successivamente serve anche per la conservazione.

Qualunque sia la maniera con cui si raccoglie il polline è bene controllarne alla fine la purezza: se vi sono, cioè, delle particelle estranee provenienti dalla pianta stessa o di altra origine, oppure pollini estranei. Questo è molto importante se successivamente i granuli sono usati per fare sieri da usare in allergologia (Cour *et* Loublier, 1980). Se il polline è usato a scopi di ricerca, è necessario saggiarne anche la vitalità.

5. TRASFERIMENTO DEL GERMOPLASMA

5.1 Conservazione temporanea del germoplasma

5.1.1 Conservazione delle accessioni di semi raccolte in campo

Le accessioni di germoplasma, ovvero i lotti o campioni raccolti in campo, prima del dispaccio alla banca, vanno conservati in un luogo fresco, asciutto ed ombreggiato. Ecco di seguito alcune raccomandazioni da seguire per una corretta conservazione delle accessioni:

- Evitare nella maniera più assoluta di lasciare il germoplasma in auto o in qualsiasi altro luogo ove vi siano alte temperature. L'esposizione ad alte temperature e all'irraggiamento diretto può, infatti, danneggiarlo o compromettere l'accessione.
- Mantenere sempre elevata la ventilazione intorno al germoplasma; avvalersi solo ed esclusivamente di buste di carta o di sacchetti in cotone, in grado di garantire una corretta traspirazione.
- Verificare sempre la corretta chiusura delle buste e dei sacchetti al fine di evitare la perdita e/o la contaminazione del germoplasma raccolto.
- Chiudere le buste preferibilmente con spilli o graffette; se si usa nastro adesivo avere cura di applicarlo solo all'esterno dell'involucro. Nel caso di semi molto piccoli può infatti accadere che all'apertura della busta questi aderiscano alla colla divenendo inutilizzabili.
- In nessun caso congelare il germoplasma prima di averlo consegnato alla banca.
- Nel caso siano stati raccolti frutti carnosi al giusto grado di maturazione, è bene spolarli il più rapidamente possibile subito dopo la raccolta per evitare fermentazioni dannose alla germinazione. Tale operazione dovrebbe essere compiuta dalla banca. Quando non è possibile consegnare immediatamente il lotto alla banca o procedere alla pulizia dei frutti carnosi, questi dovrebbero essere riposti in frigorifero a pochi gradi centigradi sopra lo zero (0-5°C).

5.1.2 Estrazione dei semi dai frutti

Nella maggior parte dei casi è meglio delegare l'operazione di pulizia alla banca o a personale esperto. Se i semi sono raccolti a completa maturazione e sono contenuti in frutti o in capsule asciutte, si può procedere in maniera rapida e accurata all'apertura dei frutti e all'asportazione manuale dei semi.

Nei frutti carnosi la tolleranza all'essiccazione si manifesta tardivamente nello sviluppo del seme. Gli indicatori morfologici di cui si è detto non sempre sono espressi dal frutto e i semi possono permanere con elevati tenori di umidità interna. Ciò che si raccomanda di fare, se il dispaccio alla banca viene posticipato di alcuni giorni, è di disporre i semi in uno strato sottile su della carta assorbente per massimizzare l'aerazione e permettere loro di deidratarsi e raggiungere l'equilibrio con le condizioni ambientali circostanti. Queste ultime dovrebbero essere mantenute il più possibile costanti, almeno per quanto riguarda umidità relativa e temperatura, e monitorate giornalmente.

5.2 Consegna alla banca

5.2.1 Accettazione delle accessioni

Trattandosi di entità spontanee, molto spesso i campioni forniti dai raccoglitori sono piuttosto modesti e disomogenei in quanto a qualità. La banca accetta comunque il lotto, per quanto possa essere esiguo e provvede negli anni successivi ad incrementare il germoplasma proveniente da quella stessa stazione attraverso ulteriori raccolte. Quando invece alle accessioni non sono allegati le schede di raccolta ed eventuali altre schede di campo, oppure quando non è possibile avere certezza della determinazione (es.: mancanza di campioni d'erbario di riferimento, di dati bibliografici certi, etc.), l'accessione non può essere accettata.

5.2.2 Documentazione da allegare all'accessione

Ai fini dell'annotazione e della successiva rielaborazione delle informazioni, è stata realizzata una scheda di campo specifica per la raccolta del germoplasma (v. 13.1) che deve essere compilata in ogni sua parte e utilizzata ogni qual volta si proceda ad un prelievo di materiale riferito ad una sola entità, in una sola stazione (o microstazione) e in un'unica data. A tale scheda la banca attribuirà successivamente il codice di identificazione del lotto, detto "numero di accessione".

Pertanto, nell'effettuare la raccolta del materiale, è fondamentale avere cura di indicare su etichette o cartellini i dati basilari per poter agevolare il riconoscimento del campione e limitare ogni dubbio di identificazione. Lo stesso procedimento andrebbe seguito nel caso di prelievo di un campione di banca dei semi del suolo.

Se il materiale proviene da altre indagini condotte *in situ* (rilievi floristici, vegetazionali, demografici, fenologici e/o segnalazioni) è necessario, oltre alla scheda di raccolta del germoplasma, allegare anche una copia delle altre schede compilate in campo.

Inoltre, il campione va sempre accompagnato da una lista riepilogativa del contenuto del collo, con l'indicazione di tutto il materiale raccolto e un recapito completo del raccoglitore in modo da poterlo facilmente rintracciare nel caso dovessero sorgere dubbi di qualsiasi natura sul materiale prodotto e nel caso sia richiesto un certificato fitosanitario (v. 5.2.3). Sarà compito del curatore della banca controllare il contenuto degli involucri e verificarne la rispondenza con la documentazione allegata.

Nel compilare le schede, le etichette e la lista riepilogativa seguire questi semplici accorgimenti:

- non usare abbreviazioni nei nomi comuni e binomi scientifici che possano indurre ad errate interpretazioni;
- scrivere in modo chiaro e possibilmente in stampatello;
- impiegare matite o pennarelli indelebili;
- evitare cancellature o correzioni che possano rendere difficili lettura e comprensione.

5.2.3 Stato fitosanitario del materiale raccolto

Il trasferimento di germoplasma vegetale può diffondere patologie o agenti patogeni. In considerazione di ciò, molti Paesi hanno elaborato una legislazione che regola l'ingresso e in alcuni casi anche il movimento interno delle piante.

La diffusione di agenti patogeni può compromettere seriamente lo stato di vitalità dei semi raccolti e il materiale, se moltiplicato, può diffondere l'infezione ad altre specie o territori. Sulla base di questi rischi bisogna documentare la presenza di patologie e lo stato sanitario della popolazione dove si sta effettuando il prelievo, nonché gli eventuali trattamenti cui è stato sottoposto il germoplasma (es.: fumigazioni, pretrattamenti fungicidi o insetticidi). Può essere perciò necessario avvalersi dell'esperienza di un fitopatologo o di un entomologo (Frison *et al.* Jackson, 1995).

In generale il rischio della diffusione di malattie è più alto là dove vengono veicolate anche radici di piante; molti agenti patogeni si annidano, infatti, nel suolo e possono essere così trasportati con il campione prelevato.

Per le entità rigenerabili vegetativamente il trasferimento del germoplasma in vitro riduce di molto questo genere di inconvenienti.

Le patologie presenti nel germoplasma movimentato andrebbero sempre annotate, così come le malattie presenti nella regione di campionamento. E' altresì importante indicare se le piante sono sane in un'area notoriamente o storicamente conosciuta come soggetta ad infestazioni.

Prima di una eventuale spedizione del materiale per fini scientifici e di conservazione, accertarsi che non sia necessario allegare un certificato fitosanitario; attualmente le normative comunitarie consentono la libera circolazione del germoplasma all'interno di tutti i territori dell'Unione Europea, mentre prevedono certificazioni di provenienza e documentazione fitosanitaria per i paesi terzi. In particolare il Decreto Ministeriale del 11/01/2005, recepisce la direttiva della Commissione del 15 ottobre 2004, che determina i modelli di certificati fitosanitari ufficiali o di certificati fitosanitari di riesportazione che accompagnano vegetali, prodotti vegetali o altre tipologie di materiale biotico provenienti dai Paesi terzi ed elencati nella direttiva 2000/29/CE.

5.2.4 Modalità di spedizione delle accessioni

Di seguito si elencano le norme generali per qualsiasi destinazione del germoplasma utilizzate dalla banca del germoplasma dei Royal Botanic Gardens di Kew, prese a tale scopo come riferimento.

I contenitori dei semi devono essere etichettati sia all'interno che all'esterno e vanno chiusi con cura. Sono raccomandati i seguenti imballaggi:

- sacchetti in cotone o in tela;
- sacchetti in nylon traspirante o in tessuto di PVC;
- scatole di cartone resistenti, all'interno delle quali vengono deposti i sacchetti contenenti il materiale.

E' sconsigliato imballare i semi in contenitori o buste non traspiranti in plastica o PVC.

Per la spedizione delle accessioni bisognerebbe pertanto procedere nel seguente modo:

- imballare i semi solo all'ultimo momento prima della spedizione;
- allegare i dettagli inerenti l'accessione e il numero di sacchetti contenuti nella scatola, avendo cura di conservare una copia di queste informazioni;
- usare del polistirolo o altro materiale per riempire i vuoti e limitare la mobilità del germoplasma all'interno della scatola;
- allegare l'apposita cedola di spedizione e conservarne una copia;
- sigillare le scatole ed etichettarle con l'indirizzo del destinatario e del mittente;
- misurare e pesare le scatole.

Le foto relative, i campioni di erbario e altro materiale utile possono essere inviati anche in un secondo momento.

5.2.5 Gestione delle accessioni provenienti da altri centri

Quanto detto fino ad ora, circa la modalità di conservazione e di spedizione delle accessioni, è da ritenersi valido anche per il materiale che non arriva direttamente dalla raccolta *in situ* ma proviene da altri organismi che operano *ex situ*, ad esempio un'altra banca del germoplasma, un orto botanico o un vivaio.

E' di grande importanza per la corretta gestione delle accessioni provenienti da altri centri raccogliere tutte le informazioni che derivano dalla gestione e dai trattamenti che i semi hanno subito prima della spedizione. Fornire al curatore della banca la cronistoria del materiale che riceve, la scheda originaria di raccolta in fotocopia e i dati per poter contattare i raccoglitori e i curatori è sempre buona norma. Anche in questo caso, se vengono spediti più lotti o più entità è sempre bene preparare una lista del materiale contenuto nel collo. Sarà cura del personale della banca conservare e gestire il lotto secondo le modalità più adatte al caso. Allegare al lotto in ingresso alla banca le eventuali schede di raccolta sul campo, le informazioni sui trattamenti antiparassitari, le modalità di conservazione, l'esistenza di protocolli di germinazione o di riproduzione in vivaio. Nel caso non si disponga di queste informazioni fornire un riferimento telefonico, la e-mail o l'indirizzo di chi ha avuto in cura l'accessione prima della sua consegna alla banca.

5.2.6 Gestione del materiale da parte della banca

Una volta ultimate le verifiche sul materiale recapitato e sulla documentazione di accompagnamento prodotta, la banca diventa responsabile della corretta gestione del medesimo, individuando i tempi e le modalità più idonee per la pulizia, conservazione e moltiplicazione del germoplasma, fatti salvi i casi in cui sussistano convenzioni specifiche.

Del materiale consegnato i curatori della banca valutano l'opportunità di lavorare l'intero lotto o parte di esso, in considerazione delle priorità individuate dalla banca, dell'importanza del materiale e della sua quantità.

6. TRATTAMENTO DEL GERMOPLASMA PRIMA DELLA CONSERVAZIONE

Di seguito viene riportato un procedimento standard, frutto delle integrazioni dei protocolli di lavoro realizzati dalle principali banche europee del germoplasma; in particolare si è tenuto conto dell'esperienza maturata dalle banche della Sardegna (BG-SAR, Centro Conservazione Biodiversità - CCB), Porquerolles (Conservatoire Botanique National Méditerranéen), Cordoba (Banco de Semillas - Jardín Botánico de Córdoba), Kew (Royal Botanic Gardens, Millenium Seed Bank Project) e Valencia (CIEF Centre d'Investigació i Experiències Forestals – Generalitat Valenciana). Ciò non esclude procedure diverse da parte di altri centri, soprattutto quando i quantitativi di seme lavorato sono elevati.

6.1 Ingresso del germoplasma nella banca

Introdotta il materiale nella banca del germoplasma, dopo aver provveduto ai controlli fitosanitari necessari, si procede alla registrazione dei dati sul database e si verifica la necessità di adottare eventuali precauzioni per la sua manipolazione, indicandole nella scheda di pulizia e conservazione, come da schema in allegato (v. 13.9). Nei locali adibiti allo stoccaggio segue la verifica dell'integrità e validità del germoplasma raccolto, con la "prova del taglio" nel caso in cui tale test non sia stato già eseguito in campo.

La registrazione delle accessioni è un'operazione di routine fondamentale per la corretta gestione del germoplasma e per l'avvio di tutte le procedure inerenti il lotto in ingresso. La banca controlla la rispondenza tra l'elenco delle accessioni fornite dal raccoglitore e le buste allegate, annotando i dubbi e l'eventuale mancato invio delle informazioni.

Nella registrazione è quindi di fondamentale importanza indicare:

- il nome del *taxon*;
 - il numero di accessione del lotto;
 - la data di ingresso nella banca;
 - la qualità della pulizia dei semi o il tipo di trattamento cui sono stati sottoposti;
 - la provenienza del lotto, intesa come nome della stazione di raccolta e come codice/nome del raccoglitore o dell'Ente che ha fornito il materiale;
 - l'obiettivo, oppure il progetto di riferimento per il quale è stata pianificata ed effettuata la raccolta.
- Il numero dell'accessione può essere un codice alfanumerico. Ad esempio, presso la Banca del germoplasma delle Alpi Sud-Occidentali, Chiusa Pesio (CN), è stato adottato un codice così composto: "NA/06/89" dove NA sta per Numero Accessione nella banca, 06 indica l'anno di riferimento (2006), 89 è un numero sequenziale che si incrementa ogni volta che si aggiunge una nuova accessione. Con l'anno successivo varierà solo la data (07) ma il numero finale continuerà a crescere. In questo modo si avrà un'intuitiva indicazione della provenienza del materiale, della sua anzianità e del suo numero identificativo tra tutti gli altri lotti.

Nell'ambito del progetto Genmedoc (v. 3.2.1) è stato invece individuato un codice di accessione così composto:

GM 1234 SA01 00/00A

GM = due lettere che identificano il progetto per il quale il lotto è stato raccolto;

1234 = quattro cifre che corrispondono al codice dell'unità tassonomica sulla quale è stata effettuata la raccolta;

SA = due lettere che identificano il partner del progetto;
01 = due cifre per il codice della popolazione all'interno della quale si è realizzata la raccolta;
00/00 = due cifre (anno)/due cifre (numero progressivo di raccolta) per identificare la raccolta;
A = una lettera per identificare il singolo campione prodotto al momento dello stoccaggio dopo tutte le fasi del trattamento.

Così il codice GM0245SA010502 - A (fig. 13) identifica il campione A della raccolta n. 2 del 2005 realizzata nella popolazione 01 "Monte Lattias – Uta (CA)" dal partner SARDEGNA del *taxon Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi et Bacch. nell'ambito del progetto Genmedoc.



Figura 13 – Esempio di etichetta automatica prodotta dal database Genmedoc.

Il numero di accessione accompagna sempre il germoplasma al quale si riferisce, permettendo di ricostruirne la cronistoria anche dopo i test di germinazione, la deidratazione, il congelamento, il dispaccio ad altri istituti e l'eventuale rigenerazione in vivaio o presso i laboratori di ricerca. Tutte le schede cartacee, le etichette, le relazioni, le analisi dati e le pagine del database dovranno sempre recare questo codice. A maggior ragione il codice comparirà nei documenti in formato elettronico in quanto la sua presenza facilita la catalogazione e manipolazione dei dati. Oltre a tali sistemi, ne esistono altri quali il codice a barre, comunemente utilizzati in ambito commerciale; questa metodologia attualmente risulta in uso presso la Banca di Germoplasma Onlus di Palermo.

6.2 Quarantena

Prima che il materiale raccolto venga introdotto nei locali della banca è opportuno rispettare un periodo di quarantena, variabile nel tempo, durante il quale il germoplasma viene stoccato in un ambiente esterno ed isolato dalle strutture della banca. Tale procedura permette di valutare lo stato fitosanitario del materiale raccolto ed in particolare di accertare l'eventuale presenza di micosi e di parassiti fitofagi o dannosi. Non è infatti raro trovare, anche in accessioni perfettamente pulite e trattate, materiale che presenta danneggiamenti o organismi dannosi in grado di compromettere il germoplasma (fig. 14).



Figura 14 – Semi di *Astragalus nitidiflorus* Jiménez Mun. et Pau parassitati. (foto: E. Mattana)

6.3 Test iniziali finalizzati alla valutazione dei lotti in entrata

Se il lotto lo consente, si possono eseguire una serie di test (germinazione, vitalità, calcolo dell'umidità interna, calcolo del numero e del peso iniziale dei semi, etc.) sul materiale fresco (frutti, semi, etc.) per disporre di dati utili al fine di pianificare la destinazione dell'accessione, il numero di repliche dei test e il numero di semi per replica, nonché per monitorare la produttività del popolamento. I risultati di ogni test vengono registrati nella scheda specifica (v. 13.8), allegati alla scheda di pulizia (v. 13.9) e a tutta la documentazione relativa all'accessione.

6.4 Frutti carnosì

I frutti carnosì sono spolpati manualmente e/o meccanicamente (prima pulizia), preferibilmente entro 48 ore dalla raccolta sotto acqua corrente, con il fine di limitare l'insorgenza di micosi e di processi fermentativi che potrebbero ridurre la capacità germinativa dei semi e comprometterne la vitalità. Nei casi in cui non sia possibile effettuare tempestivamente la spolpatura, il materiale deve essere conservato temporaneamente in cella frigorifera a temperature comprese tra 0° e 5°C. Se, al momento della raccolta, i frutti sono troppo disidratati, prima di essere sottoposti alla spolpatura, devono essere immersi in acqua per un periodo che varia da poche ore ad alcuni giorni, al fine di rendere più facile la pulizia e la separazione del seme.

Dopo la spolpatura i semi devono contenere solo impurità di piccole dimensioni, diversamente è necessario ricorrere ad una seconda spolpatura manuale (più selettiva della precedente) in un contenitore pieno d'acqua, ove è possibile rimuovere i residui carnosì più minuti.

I semi estratti dai frutti sono fatti sgocciolare dell'acqua in eccesso e messi ad asciugare, per un periodo variabile da uno a sette giorni in funzione del seme e delle condizioni ambientali. Successivamente si procede all'eliminazione manuale dei residui inerti presenti e alla deidratazione, secondo le procedure utilizzate per i frutti non carnosì specificate più innanzi (v. 6.9).

Quando i quantitativi da processare sono consistenti, possono essere impiegate denocciolatrici meccaniche.

6.5 Postmaturazione

Per postmaturazione si intende il processo di maturazione fisiologica che si verifica nei semi e nei frutti dopo la loro raccolta. La postmaturazione è necessaria ai semi immaturi per acquisire la competenza alla germinazione (Schmidt *et Jøker*, 2001).

Infatti al momento della raccolta, nonostante attente osservazioni, è frequente raccogliere semi a diverso grado di maturazione. Al fine di ottenere un campione omogeneo il periodo di postmaturazione consente di portare a maturità i semi atti a svilupparsi. Per fare questo il materiale viene conservato temporaneamente all'interno di vaschette di plastica, cartone, alluminio o acciaio (fig. 15) per un periodo variabile solitamente da alcune settimane fino a un massimo di un mese in funzione del *taxon* (avendo cura di spolpare i frutti carnosì). La temperatura ambiente deve essere mantenuta al di sotto dei 20°C e l'umidità relativa inferiore al 40%. Per periodi di stoccaggio superiori al mese è opportuno abbassare ulteriormente la temperatura. Il rischio che si corre è quello di accelerare il processo di invecchiamento del campione, questo comporta una difficoltà di interpretazione dei test di germinazione e una conservazione ridotta nel tempo.

In questa fase il materiale stoccato viene privato delle impurità (rami secchi, foglie e detriti di suolo), ma non viene manipolato. In tale maniera i semi non si disidratano rapidamente e in base alle condizioni di raccolta e al tipo di frutto viene indicata approssimativamente la data entro la quale il germoplasma potrà essere manipolato. Il materiale, omogeneamente distribuito sul fondo dei contenitori precedentemente citati, viene rimescolato ogni 2-3 giorni per assicurare uniformità di trattamento e favorire una migliore aerazione e conseguente deidratazione, avendo cura di coprire i contenitori con un telo a maglia molto fine in modo da evitare la contaminazione con semi provenienti da altre accessioni.



Figura 15 – Lotti di semi in postmaturazione nei locali della Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR). (foto: L. Podda)

6.6 Pulizia e lavorazione

Dei semi aventi i requisiti adeguati, viene ripulito un piccolo quantitativo per essere testato al fine di stimare la percentuale di germinabilità e la validità del materiale raccolto.

La procedura di lavoro sarà considerata valida e i semi potranno continuare ad essere manipolati, se la percentuale di germinazione sarà risultata maggiore del 50%, escludendo i casi in cui l'entità presenti difficoltà di reperimento del germoplasma in quantitativi sufficienti, il caso in cui il popolamento sia a rischio d'estinzione oppure quando la naturale germinabilità della specie sia di per se molto bassa.

I risultati del test di germinazione in ingresso non sono tuttavia facilmente confrontabili con i test eseguiti su materiale deidratato e/o conservato, in quanto al momento della raccolta i semi non presentano tutti lo stesso grado di maturazione (es.: *Fabaceae*) e necessitano di un periodo di postmaturazione. La bontà del lotto in entrata può essere in alternativa stimata sia attraverso osservazioni dirette (colore, dimensioni, presenza di parassiti), sia attraverso l'esecuzione di test di vitalità come la prova del taglio nel caso questa non sia stata effettuata in campo al momento della raccolta.

Dai semi vengono eliminate le impurità residue come polveri, residui resinosi, semi vuoti o abortivi, semi compromessi da insetti e/o intaccati e quindi non conservabili. Le operazioni necessarie a questa fase di lavorazione possono essere eseguite meccanicamente, manualmente o in entrambe le modalità.

6.6.1 Estrazione manuale

In molti casi l'uso di tecniche meccaniche provoca il danneggiamento del seme, esponendolo ad infezioni fungine e deterioramento dei tegumenti. L'intervento manuale, nonostante sia particolarmente dispendioso in termini di lavoro, quasi sempre si ritiene necessario per disarticolare i frutti o le infruttescenze. La tecnica manuale generalmente utilizza un basamento di plastica morbida sulla quale vengono posati piccoli quantitativi di frutti o infiorescenze. Un operatore, grazie all'ausilio di

un tampone di legno (rivestito inferiormente dello stesso materiale plastico impiegato come basamento), esercita una forza più o meno perpendicolare al piano di lavoro, tale da sminuzzare e separare i semi dagli organi florali o fruttiferi, che possono essere separati con l'ausilio di setacci d'intermaglia variabile (fig. 16).

Nei casi in cui non sia attuabile questa tecnica, il lavoro può essere eseguito manualmente con l'impiego di utensili e/o strumenti di laboratorio (es.: pinze, pinzette, puntali, etc.). Quando invece la dimensione dei semi è molto piccola o addirittura microscopica (es.: *Plumbaginaceae*, *Scrophulariaceae*, *Orchidaceae*) l'intervento di macchinari non è in grado di separare i semi dalle piccolissime infiorescenze e si rende necessario l'impiego di strumenti ottici come stereoscopi e lenti d'ingrandimento.



Figura 16 – Batteria di setacci. (foto: E. Mattana)

6.6.2 Estrazione a freddo

Tale tecnica viene utilizzata per i generi *Abies*, *Cedrus* e per alcune specie del genere *Pinus*, sebbene con procedure caratteristiche per ogni specie. Al termine della postmaturazione, le brattee dei coni si aprono in modo pronunciato e il seme può essere estratto con una semplice macchina vagliatrice. Poiché si tratta di specie ricche di resina è necessario attendere che questa si secchi prima della vagliatura. Il passaggio nel vaglio produce un miscuglio composto di semi alati, polveri, squame frammentate, semi vani, pezzi di aghi, piccioli, rametti, etc. dal quale, dopo la disalatura, si deve selezionare il seme pulito. Il successo dell'operazione è certo quando i coni si raccolgono dalla pianta nel momento in cui le brattee iniziano a staccarsi tra loro (Gorian, 2001). Talvolta sono necessarie operazioni manuali, sia previamente al vaglio che successivamente allo stesso.

6.6.3 Estrazione a caldo

Questa procedura si applica ai generi *Cupressus* e *Pinus*, con poche eccezioni. Può essere impiegata anche per l'estrazione di semi di *Fagus* e *Alnus*. I coni, ben chiusi e scarsamente resinosi, vengono puliti con apparecchiature meccaniche e, successivamente, stesi su superfici legnose per la postmaturazione. Correnti d'aria e saltuari rimescolamenti, durante quest'ultima fase, facilitano la deidratazione. Trascorso un periodo, che varia a seconda della specie, i coni cominciano ad aprirsi e consentono la lavorazione a caldo. Il trattamento viene effettuato in appositi forni, le cui temperature e tempi d'esercizio variano in relazione alla specie ed al contenuto d'umidità degli strobili. Per non compromettere la vitalità del seme, la temperatura non deve in nessun caso superare i +50°C (Gorian, *op. cit.*).

Alla fase di estrazione, segue la fase di selezione e pulizia dei semi che eliminerà le impurità residue quali polveri, residui resinosi, semi vuoti o abortivi, semi danneggiati da insetti e comunque non conservabili. Le operazioni necessarie a questa fase di lavorazione possono essere eseguite meccanicamente, manualmente o in entrambe le modalità.

6.6.4 Operazioni meccaniche con attrezzatura da laboratorio

La lavorazione di modeste quantità di seme è normalmente eseguita con piccole macchine da laboratorio (Gorian, *op. cit.*). Le più comuni attuano una selezione di tipo gravimetrico (fig. 17), sfruttando un flusso d'aria che separa le impurità dalle sementi e allo stesso tempo i semi viabili da quelli vuoti, standardizzando conseguentemente i semi per dimensione e peso.

Ogni stock di semi richiederà un numero di cicli direttamente proporzionale all'omogeneità del materiale e al tipo di germoplasma oggetto di pulizia. Grazie alle diverse regolazioni dei flussi d'aria, nei primi cicli vengono eliminate le impurità e le polveri, in seguito viene selezionato il seme. Va tuttavia considerato che tali operazioni, se non correttamente eseguite, possono portare ad un impoverimento genetico dell'accessione rispetto alla popolazione di provenienza, in quanto si potrebbe avere la perdita di tutti quei semi che, seppur vitali, hanno un peso non discriminabile rispetto al materiale di scarto. A fine lavoro, è possibile valutare in modo approssimativo lo scarto percentuale dei semi e la resa della campagna di raccolta relativa ad ogni singola accessione. Nel caso in cui si debbano lavorare grossi quantitativi di semi e non venga richiesto un grado di pulizia elevato, ad esempio nel caso di lotti destinati per la semina a spaglio, è possibile ricorrere a macchinari di tipo industriale (fig. 18 e 19).



Figura 17 – Macchina per la selezione gravimetrica del germoplasma in uso presso BG-SAR. (foto: E. Mattana)



Figura 18 - Macchina a flusso d'aria e con cilindro dentato per la separazione dei semi del CNNGF El Serranillo. (foto: A. Prada)



Figura 19 – Macchina a flusso d'aria per la pulizia di grandi lotti di semi in uso presso il Blanc de Llavors Forestals (CIEF). (foto: A. Prada)

6.6.5 Operazioni manuali o miste

In alcuni casi, le tecniche automatizzate non sono in grado di svolgere perfettamente il lavoro, in quanto la ridottissima dimensione dei semi è simile alla dimensione delle polveri o dei tessuti finemente sminuzzati o ridotti in polvere. A tal fine si utilizza una batteria di setacci (fig. 16) con diametro di intermaglia variabile da 1 cm a 0,1 mm, per favorire l'eliminazione selettiva di impurità. Nei casi più complessi i semi vengono separati manualmente con l'ausilio di pinzette e utensili da laboratorio.

L'impiego combinato di tecniche manuali e meccaniche riguarda quei casi in cui ad una prima pulizia manuale grossolana ne segue una meccanica e successivamente un'altra manuale di precisione e rifinitura.

6.7 Quantificazione dell'accessione e analisi del germoplasma

Verificato il grado di purezza e lo stato di pulizia del materiale, i semi vengono contati rapportando al peso totale dei semi puliti il peso medio di un seme. Esistono diversi sistemi d'analisi d'immagini (v. 10.5) che consentono la misura del peso e del numero di semi di un campione senza che questo venga contato previamente, per fare ciò il lotto non deve però presentare impurezze.

Contestualmente devono essere eseguite una serie di osservazioni sul germoplasma (tegumenti, endosperma, cotiledoni, embrione, etc.) al microscopio, allo stereoscopio o al negatoscopio in modo da poter individuare anomalie o evidenziare caratteri peculiari dell'unità tassonomica analizzata.

Viene inoltre determinato il contenuto di umidità interna (*moisture content* o mc%) dei semi, indispensabile per individuare i tempi e i modi della deidratazione per la successiva conservazione. Il tenore di umidità determina in larga misura l'intensità della respirazione, influenzando sulla velocità dei processi metabolici e, di conseguenza, sulla longevità dei semi. In generale, questo dato (mc%) si ottiene attenendosi agli standard ISTA e in particolare seguendo le regole di seguito specificate (IBPGR, 1982):

- Minimizzare il tempo durante il quale i semi sono esposti alle condizioni ambientali di laboratorio.
- La determinazione è eseguita su due repliche provenienti da campioni preventivamente mescolati.
- Per le accessioni di semi molto umidi potrebbe essere necessaria una predeidratazione.
- Per alcune categorie di semi è necessaria una frantumazione (es.: *Poaceae* e *Fabaceae*).
- I contenitori per l'essiccazione devono essere di vetro o di metallo, dotati di coperchi ermetici per impedire variazioni di umidità. Prima di venire utilizzati devono essere essiccati in stufa per un'ora a 130°C e collocati in un disseccatore per raffreddarsi.
- Devono essere pesati 4,5–5 g di semi per replica nei contenitori precedentemente pesati. Nel caso in cui le accessioni di semi siano estremamente limitate dovrebbe essere sufficiente, anche se meno accurato, utilizzare due repliche da 0,5 g ciascuna.
- I semi con un alto contenuto in olii ed i semi delle specie arboree devono essere essiccati a temperature più basse al fine di evitare la volatilizzazione delle essenze: $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 17 ± 1 ore (trattamento a bassa temperatura). I semi delle altre specie a 130° – 133°C per 1 ora (trattamento ad alta temperatura), ad eccezione del mais ed altri cereali per i quali il periodo di esposizione è rispettivamente di 4 e 2 ore. L'essiccazione deve essere eseguita in stufe a ventilazione forzata. Dopo l'essiccazione, i contenitori devono essere chiusi, raffreddati in un disseccatore per 30–45 minuti e quindi ripesati.

- Il contenuto di umidità su base umida è calcolato come perdita in peso ed espressa come percentuale ad una cifra decimale. Se M_1 è il peso del contenitore (con coperchio), M_2 il peso del contenitore e dei semi prima dell'essiccazione e M_3 il peso del contenitore e dei semi dopo l'essiccazione, il mc% è dato dalla formula:

$$mc\% = 100 \times (M_2 - M_3) / (M_2 - M_1)$$

Il significato di questo parametro varia a seconda dello stadio fisiologico in cui si trova il seme al momento dell'analisi e ci aiuta a capire se il seme è pronto per essere conservato o deve essere deidratato ulteriormente.

Il calcolo dell'umidità presente nel seme può essere eseguito anche con particolari strumenti elettronici, chiamati analizzatori di umidità o termobalance (fig. 20), che contemporaneamente pesano e disidratano il campione grazie ad una regolazione computerizzata (Suszka *et al.*, *op. cit.*; ISTA, 2006). Le repliche vengono frantumate per favorire la perdita d'acqua attraverso i tegumenti e inserite all'interno dello strumento. La temperatura di esercizio, che può essere selezionata dall'operatore, è solitamente di 105°C per evitare la vaporizzazione di sostanze organiche quali olii. Lo strumento pesa e contemporaneamente brucia, generalmente mediante raggi infrarossi, il campione spegnendosi automaticamente, nel caso non sia stato preimpostato un tempo di esecuzione, una volta che il calo ponderale diventa stabile.



Figura 20 – Esempi di analizzatori elettronici di umidità o termobalance, in uso presso la Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR) e al Banc de Llavors Forestals (CIEF). (foto: E. Mattana)

6.8 Test qualitativi

Tra i fattori che condizionano la qualità del seme si ricordano il corredo genetico, l'età e il tipo di gestione cui viene sottoposta la pianta madre, le condizioni climatiche e fisiologiche della pianta madre durante la formazione del seme, il grado di maturità al momento della raccolta, la tecnica di raccolta, la lavorazione e i metodi di conservazione (Piotto *et al.*, 2001). La qualità può esprimersi attraverso parametri utili a correlare il comportamento del seme *in situ* ed *ex situ*. Prima di essere conservati i semi dovrebbero essere sottoposti a diversi test qualitativi, quali la determinazione della capacità germinativa e della vitalità; vi sono, inoltre, altre prove che caratterizzano geneticamente il

seme ed altri aspetti importanti della fisiologia non evidenziati dal saggio di germinazione. Nel presente capitolo si evita la descrizione approfondita dei test di più largo impiego, che sono bene illustrati nei “Metodi ufficiali di analisi delle sementi” (Ministero Agricoltura e Foreste, 1993; v. 2.2.1) nonché nelle *International Rules for Seed Testing* dell’*International Seed Testing Association* (ISTA, 2006), ma si evidenziano gli aspetti critici nonché le motivazioni delle diverse prove. Di seguito vengono riportati i parametri più studiati ed i test maggiormente impiegati per valutare le caratteristiche qualitative dei semi.

6.8.1 Capacità germinativa

Si indica con capacità germinativa la percentuale di semi germinati (normali ed anormali). Rappresenta il parametro più usato per valutare un lotto di semi, ma non è sufficiente per esprimere altre componenti della qualità degli stessi. L’ISTA definisce la germinazione come l’emergenza e lo sviluppo che porta il seme a raggiungere uno stadio in cui l’aspetto è in grado di indicare se sarà capace di svilupparsi ulteriormente in una pianta normale, sempre che le condizioni ambientali lo consentano (ISTA, 2004). Alcuni autori considerano la germinazione come l’emergenza e lo sviluppo della plantula attraverso l’emissione della radichetta per 1 mm, limite minimo di osservazione macroscopica per l’osservatore. La velocità è da considerarsi un aspetto importante nell’ambito della germinazione, può fornire importanti informazioni sulla qualità del seme ma, spesso non risulta indicativa della presenza di eventuali tare genetiche determinate, ad esempio, da fenomeni di introgressione (es.: *Orchidaceae*).

6.8.2 Vitalità

Un seme si considera vitale quando presenta le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche essenziali alla sua germinazione. Il calo di vitalità è solitamente accompagnato dalla riduzione della capacità respiratoria, contenuto di acidi grassi insaturi, lipidi di membrana, attività enzimatiche e contenuto di mRNA. I saggi per determinare la vitalità forniscono solo una stima della qualità del seme (indicano se il seme è “vivo” o no), ma sono molto rapidi (24/48 ore) rispetto alle prove di germinazione classiche, che richiedono spesso tempi più lunghi. La vitalità non deve essere confusa con la capacità germinativa, infatti, i semi vitali ma dormienti, non necessariamente germinano. Di seguito, vengono elencati alcuni test per determinare la vitalità dei semi.

Prova del tetrazolio

La prova del tetrazolio è una prova colorimetrica che utilizza una soluzione all’ 1% di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro o bromuro a pH 6.5-7.5 (ISTA, 2006), fotosensibile, trasparente e solubile in acqua. Tale soluzione imbibisce le cellule dei tessuti e, per opera di enzimi deidrogenasi, viene modificata in un composto insolubile rosso, noto chimicamente come “formazan”. Questo test colorimetrico viene utilizzato quando si ha la necessità di determinare in tempi brevi la vitalità del lotto, oppure quando si deve verificare la vitalità dei semi a seguito di un test di germinazione che non ha dato risultati soddisfacenti. Si impiega anche quando si lavora con semi di *taxa* che presentano una profonda dormienza o, comunque, un periodo di germinazione molto lungo. La colorazione risultante alla fine della prova colorimetrica può essere di una tonalità di rosso più o meno marcata per i tessuti sani e vitali, mentre le parti morte o danneggiate non si colorano. Questo test tende a sovrastimare la vitalità di circa il 10% rispetto al valore che si ottiene con le prove di germinazione (Piotto *et al.*, 2001).

Indigo-carmin

L'indigo-carmin è un test colorimetrico utilizzato in alcuni Paesi in alternativa al tetrazolio per i suoi costi più contenuti e per la procedura relativamente semplice. Si tratta di un procedimento che fa uso di una soluzione di destrosio e di idrossido di sodio. I semi vengono liberati dai tegumenti dopo essere stati lasciati in imbibizione per 24 ore in acqua distillata. In seguito vengono estratti gli embrioni e immersi, a seconda della specie per 1-2 ore, in una soluzione di indigo-carmin diluito a 1/2000, a 20°C al buio; successivamente vengono risciacquati ed esaminati. I tessuti morti si coloreranno in blu, mentre i tessuti vivi non si coloreranno (Suszka *et al.*, *op. cit.*).

Soluzione di Lugol

Soluzione a base di ioduro di potassio e di iodio. Il colorante reagisce con l'amido provocando il viraggio al blu dei tessuti dell'embrione che contengono amido e che per questo si presumono essere vitali.

Prova di conducibilità

Prova che valuta l'integrità di tessuti e membrane cellulari, quindi indirettamente la qualità. Il seme con membrane danneggiate e sottoposto ad imbibizione, subisce una perdita di contenuti cellulari (ioni, carboidrati, etc.) che modifica le caratteristiche della soluzione in cui è immerso e fornisce una misura di conducibilità elettrica. Il vantaggio di questo test, messo a punto per un numero limitato di specie, è la rapidità e semplicità di esecuzione (Piotto *et al.*, 2001).

Prova con diacetato di fluoresceina

Saggio colorimetrico per la stima rapida della vitalità dei semi. Si impiega anche per determinare la vitalità di polline, radici di entità arboree, colture meristematiche e semi di *Orchidaceae*. Il diacetato di fluoresceina penetra rapidamente all'interno delle cellule vitali aventi membrane integre; l'enzima esterasi lo trasforma in un prodotto fluorescente che si diffonde nelle cellule. Attraverso l'uso di microscopi a fluorescenza, dotati di speciali fonti di luce e filtri, è possibile la quantificazione degli embrioni e tessuti vitali, oltreché di quelli danneggiati (Piotto *et al.*, 2001).

Analisi radiografica

Metodo che fornisce indicazioni abbastanza precise sullo sviluppo dell'embrione e sul grado di maturazione del seme, nonché sull'eventuale presenza di larve o di altri patogeni. La radiografia è un metodo di indagine non distruttivo, che risulta molto utile per il germoplasma di entità di cui si dispone di poco materiale o per quelle in pericolo d'estinzione. Questo metodo è comunemente utilizzato per i semi delle conifere. Tenuto conto dei costi relativamente elevati delle strumentazioni necessarie e delle precauzioni che devono essere mantenute, il suo impiego è attualmente limitato (Suszka *et al.*, *op. cit.*; Martin *et al.*, 1998; Gudin *et al.*, 1992).

Risonanza magnetica

In alcuni casi, i risultati ottenuti con la radiografia non riflettono accuratamente la qualità dei tessuti, soprattutto quando si valutano semi completamente imbibiti. I tessuti vitali imbibiti possono essere confusi con quelli non vitali, mentre è più facile distinguerli quando il contenuto di umidità dei semi è ridotto. La risonanza magnetica è una tecnica non distruttiva che fornisce immagini di protoni (H⁺) legati all'acqua dei tessuti ed alle catene degli acidi grassi. Può quindi seguire i movimenti dei metaboliti e risulta particolarmente utile per valutazioni relative alla fisiologia dei semi. Tramite elaborazioni computerizzate si possono ottenere immagini ad alta risoluzione, impiegate per lo studio della struttura e della distribuzione dei lipidi nei semi (Piotto *et al.*, 2001).

6.8.3 Prove di vigore

Il vigore dei semi è definito come la somma totale di quelle proprietà che determinano il livello di attività ed il comportamento dei lotti durante la germinazione in una vasta gamma di ambienti (ISTA, 2004). Il vigore non si può misurare attraverso un unico parametro perché è un concetto che comprende diversi aspetti del comportamento dei semi, tra cui la velocità e uniformità della germinazione e dello sviluppo delle plantule; la capacità di emergenza delle plantule in condizioni sfavorevoli; il comportamento in seguito alla conservazione (in particolare la capacità di mantenere la germinabilità iniziale). Semi vigorosi sono potenzialmente capaci di avere un comportamento ottimale in condizioni che non sono considerate ideali per la specie a cui appartiene il campione.

Le differenze di vigore si possono manifestare nei processi biochimici e nelle reazioni in atto durante la germinazione (reazioni enzimatiche, attività respiratoria, etc.), nella velocità e uniformità di emergenza dei semenzali, nella crescita durante l'allevamento e dopo la messa a dimora e nella capacità di germinazione in condizioni ambientali sfavorevoli. Il grado di vigore può condizionare la crescita delle piante adulte, nonché la loro fruttificazione e resa. La definizione di vigore riguarda i semi e l'attecchimento iniziale dei semenzali, ma non considera l'eventuale dormienza e la composizione genetica. Le prove che si basano su aspetti specifici del comportamento del seme durante la germinazione, ad esempio la prova dell'invecchiamento accelerato, il *cold-test* (Piotto *et al.*, 2001) ed il saggio di conducibilità, sono generalmente impiegate per la valutazione di determinate e specifiche componenti del vigore (Piotto *et al.*, 2001; Elias *et al.*, 2006).

6.9 Deidratazione

6.9.1 Tolleranza alla deidratazione e categorie di conservazione

I semi possono essere classificati in due categorie principali in base alla loro risposta alla deidratazione ed al loro comportamento durante la conservazione. Il primo gruppo, definito dei “semi ortodossi”, comprende quei semi la cui conservazione è sostanzialmente funzione del contenuto di umidità e della temperatura. Tale tipologia di semi può essere portata senza danni a bassi valori di umidità (anche a livelli molto inferiori rispetto a quelli raggiunti in condizioni naturali); la loro longevità aumenta con il diminuire della temperatura e del contenuto in umidità e può essere calcolata mediante l'equazione di vitalità dei semi (Roberts, 1973; Ellis *et Roberts*, 1980; Ellis, 1988; Pritchard *et Dickie*, 2003). Oggi i semi ortodossi sono anche chiamati “tolleranti alla deidratazione”. Appartengono a questo gruppo la maggior parte dei semi delle specie che vegetano alle nostre latitudini (Hong *et al.*, 1998). Le possibili alterazioni (tab. 1) che possono subire i semi ortodossi durante la conservazione, in relazione al tenore idrico contenuto, possono essere così sintetizzate:

Tabella 1 – Alterazioni dei semi ortodossi durante la conservazione a basse temperature in funzione del contenuto idrico.

Contenuto idrico di semi ortodossi (%)	Possibili alterazioni durante la conservazione a basse temperature
Inferiore al 5	Ossidazione dei lipidi
Tra 5 e 6	Praticamente nessuna (livello ideale per la conservazione dei semi di molte specie)
Tra 10 e 18	Marcato sviluppo dell'attività delle crittogame
Superiore al 18	Aumento della respirazione
Superiore al 30	Germinazione di semi non dormienti

La tolleranza all'essiccazione è legata principalmente alle proprietà del protoplasma cellulare. Per poter affrontare la deidratazione i tessuti cellulari debbono essere capaci di limitare o riparare i danni subiti, mantenere la propria integrità fisiologica durante il periodo in cui il tessuto è secco e provvedere, durante la fase di reidratazione, alla mobilitazione dei meccanismi necessari all'eventuale riparazione dei tessuti (Black *et Pritchard*, 2002). Nello specifico, alcuni dei meccanismi che consentono l'essiccazione riguardano la capacità di semplificare le strutture intracellulari (in particolare i mitocondri); l'abilità di inibire l'attività metabolica; l'efficienza dei sistemi antiossidanti; la capacità di elaborare proteine protettive delle membrane cellulari (dette proteine LEA); l'esistenza di proteine idrofobe che circondano i corpi grassi e impediscono loro di agglomerarsi durante la deidratazione, nonché la capacità di vetrificare durante l'essiccazione alcune sostanze come gli zuccheri (Berjak *et Pammenter*, 2002).

Il secondo gruppo, dei “semi recalcitranti”, chiamati anche “sensibili alla deidratazione”, comprende quei semi che non tollerano una deidratazione significativa rispetto al contenuto di umidità presente al momento della disseminazione (in genere variabile tra il 20 ed il 70%, ma più frequentemente tra 30 e 50%). Tali semi non possono essere conservati con alti livelli di umidità perché tendono a germinare in tempi brevi e nemmeno possono essere mantenuti a temperature inferiori allo zero, in quanto i tessuti subirebbero danni determinati dal congelamento dell'acqua disponibile al loro interno. Per la conservazione di tale tipologia di semi si sta sviluppando una tecnica alternativa che prevede la crioconservazione in azoto liquido degli embrioni (v. 7.1.3), strutture molto piccole, assai resistenti alla dissecazione e relativamente uniformi per dimensioni e contenuto in umidità e pertanto in grado di essere sottoposti a una deidratazione crioprotettiva controllata. Esperimenti positivi in tal senso sono stati realizzati con varie specie dei generi *Quercus*, *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* e *Shorea*.

Considerato l'elevato contenuto di umidità dei semi recalcitranti, questi generalmente presentano alto peso e grosse dimensioni, più evidenti in semi di specie forestali. La percentuale di acqua al momento della dispersione è un buon indice dell'attitudine alla conservazione; un valore elevato caratterizza i semi di difficile conservazione.

Il 7% dei semi di quasi 7.000 specie sino ad oggi studiate, appartenenti a 65 famiglie, sono risultati recalcitranti (Hong *et al.*, *op. cit.*), ma poiché manca informazione approfondita sulle diverse flore del mondo è probabile che tale cifra sia destinata a cambiare. Appartengono a questo gruppo i semi di numerose piante tropicali (cocco, mango, avocado, cacao, etc.) ma anche importanti specie arboree delle nostre latitudini (es.: *Quercus*, *Aesculus*, *Castanea*). Tra i semi più sensibili alla deidratazione si annoverano i cosiddetti “vivipari” perché iniziano la germinazione quando ancora sono nella pianta madre (oppure simultaneamente alla dispersione), come avviene in alcune piante acquatiche di grande importanza ecologica (es.: mangrovie). Le *Fagaceae*, *Moraceae*, *Sapotaceae* e *Lauraceae* sono famiglie con elevato numero di specie con semi sensibili alla deidratazione.

Per quanto esposto ne deriva che i semi recalcitranti non formano banche di semi del suolo mentre questa attitudine è più frequente tra i semi ortodossi.

Una terza categoria è quella dei “semi intermedi” (Dickie *et Pritchard*, 2002) che comprende quei semi che sopportano meglio la deidratazione rispetto ai recalcitranti, ma peggio in rapporto agli ortodossi. Una volta parzialmente deidratati non tollerano lo stress procurato dalle basse temperature (inferiori allo 0°C), ma si comportano meglio se esposti a temperature più miti (intorno a 15°C). In generale questa tipologia di semi tollera una deidratazione fino a valori di umidità compresi tra 10 e 20% (Hong *et al.*, *op. cit.*).

E' bene considerare che l'identificazione delle categorie descritte aiuta nella gestione del germoplasma ma queste non sono rigide, c'è di fatto un *continuum* di condizioni tra il seme più ortodosso e quello più recalcitrante. Volendo esemplificare si cita la longevità dei semi di pomodoro che possono essere conservati per più di 25 anni (a -18°C e 5% di contenuto di umidità) mentre quelli della pianta del tè (*Camellia sinensis* Kuntze) rimangono vitali per sole 2-8 settimane (Walters, 2004). Benché ci sia una generale tendenza delle banche del germoplasma ad unificare i criteri di lavoro, i protocolli applicati per definire la categoria dei semi non sono ancora abbastanza omogenei. Ciò può comportare che una stessa specie venga considerata recalcitrante da alcuni e ortodossa o intermedia da altri. E' invece frequente che, per una data specie con semi recalcitranti, la tolleranza all'essiccazione sia più elevata nelle popolazioni che vegetano nelle zone meno umide dell'areale di distribuzione. In alcuni casi tecniche adeguate applicate al processo di deidratazione hanno consentito la lunga conservazione di semi ritenuti recalcitranti (es.: *Fagus sylvatica* L.).

A livello globale, la gestione delle risorse genetiche delle specie che vegetano in zone tropicali umide è uno dei problemi più complessi. In questo contesto sono la difficile conservabilità e la limitata longevità dei semi di alcune specie a provocare la maggiore preoccupazione. La rapida deperibilità dei semi è già documentata dal VI secolo d.C. Uno studioso cinese riferisce sul modo migliore per conservare le castagne (probabilmente *Castanea mollissima* Blume). Dagli anni '70 ricerche molto approfondite hanno riguardato la conservazione dei semi recalcitranti di alcune *Fagaceae* di importanza ecologica ed economica in Europa, seguite poi da molti studi su altri semi non tolleranti all'essiccazione (Suszka *et al.*, *op. cit.*; Piotto *et al.*, 2004; Black *et al.*, *op. cit.*). Tuttavia, le conoscenze e la tecnologia a disposizione non consentono di programmare accuratamente la conservazione e gestione delle risorse genetiche legate a specie con semi altamente deperibili.

6.9.2 Camera di deidratazione

Il calo di umidità dei campioni di seme può essere raggiunto in vari modi, compresa l'esposizione all'aria in ambienti asciutti, ventilati ed ombreggiati. Le banche del germoplasma però si affidano generalmente alle camere di deidratazione che, seppur abbastanza costose, forniscono risultati ottimali. Il materiale destinato alla deidratazione viene stoccato in una camera (fig. 22) che, mediante deumidificatori e condizionatori d'aria, garantisce valori di umidità relativa del 10-15% e temperature comprese tra 10 e 25°C (FAO/IPGRI, 1994), per evitare che i tegumenti seminali subiscano brusche fratture e/o raggrinzimenti. Questo trattamento ha una durata diversa in funzione delle caratteristiche dei semi e può variare da 30 a 180 giorni. E' importante che i locali nei quali avviene la deidratazione permettano una buona circolazione d'aria, garantendo 10 ricambi d'aria all'ora (IPGRI, 1982). In queste condizioni i lotti vengono sottoposti a deidratazione all'interno di buste di carta, sacchetti di tessuto traspirante o vaschette (fig. 22) e pesati regolarmente per monitorarne il calo di peso; se W_f è il peso che corrisponde al 5±1% di contenuto di umidità interna (o *moisture content*) finale (mc_f), e W_o è il peso dell'accessione all'inizio della deidratazione, si può determinare il peso finale (peso target) che deve raggiungere l'accessione al termine del processo, secondo la formula (IBPGR, *op. cit.*):

$$W_f = W_o \times (100 - mc_o) / (100 - mc_f)$$

con $mc_o = mc\%$ all'origine
e $mc_f = 5\pm 1\%$

In ogni momento è possibile verificare il contenuto in umidità dell'accessione (mc_f) con la formula inversa:

$$mc_f = 100 - [(W_o / W_f) \times (100 - mc_o)]$$

con mc_f e $W_f = mc\%$ e peso dell'accessione al momento della pesata.

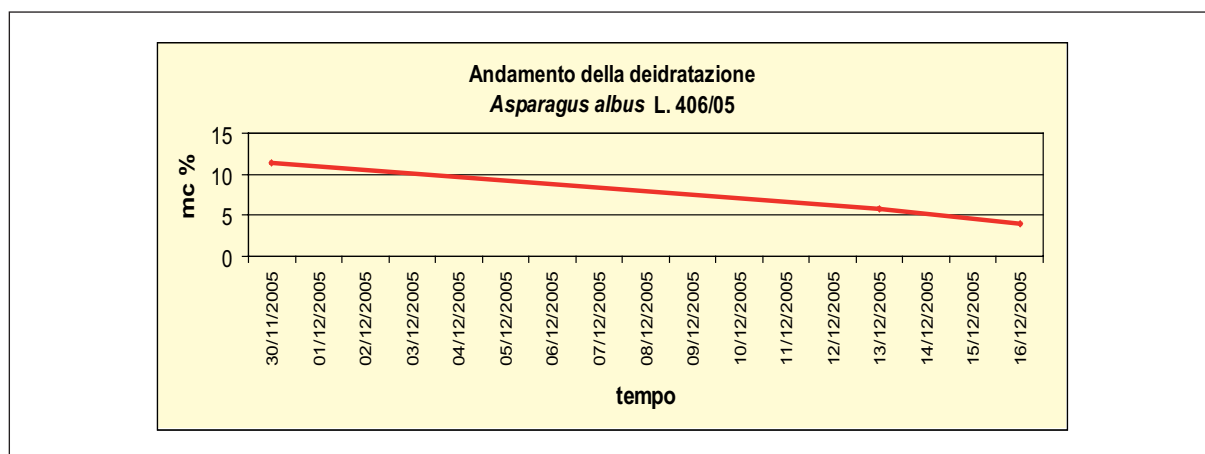


Figura 21 – Monitoraggio della deidratazione di una accessione di *Asparagus albus* L. (dati: BG-SAR)

Verificato che il contenuto di umidità sia compreso tra il 3.5% (per i semi aventi un alto contenuto in olii) e il 6.5% (per i semi a basso contenuto in olii), tali valori di $mc\%$ corrispondono ad una umidità relativa all'equilibrio (ERH) del 15% a 15°C (Linington, 2003), i semi sono considerati pronti per la conservazione a lungo termine a basse temperature (Roberts, 1973; Ellis *et* Roberts, 1980) (fig. 21), attraverso, generalmente, la congelazione a temperature inferiori ai -18°C (FAO/IPGRI, *op. cit.*). I semi tuttavia, possono anche essere conservati in strutture frigorifere a temperature generalmente comprese tra -5°C e 5°C.



Figura 22 - Strutture per la deidratazione presso BG-SAR: umidostato con valori ambientali di umidità relativa e temperatura, deumidificatore ad assorbimento chimico e materiale stoccato. (foto: E. Mattana)

Ultimamente si sta sviluppando (fig. 23) un metodo alternativo per monitorare l'umidità interna dei semi durante la deidratazione. Tale metodo presenta l'enorme vantaggio, a differenza del calcolo dell' $mc\%$, di non essere distruttivo e si basa sulla determinazione di un parametro definito come "attività dell'acqua" (a_w , activity water) che, in una scala da 0 a 1, rappresenta l'umidità relativa misurata alle condizioni di equilibrio (ERH) tra il contenuto in acqua all'interno del seme e nell'ambiente circostante.

I valori di a_w e di mc% sono correlabili mediante una curva isoterma (Probert, 2003) che, tuttavia, varia sia in funzione della composizione del seme, sia della temperatura. Per questo motivo l'esatta correlazione tra i due parametri può essere determinata soltanto empiricamente rilevando entrambi i valori per ogni tipologia di seme. La determinazione dell' a_w e quindi dell'ERH, rappresenta di per sé una misura sufficientemente accurata per valutare, seppur indirettamente, il contenuto in acqua dei semi.

6.9.3 Dessiccanti artificiali

La deidratazione delle accessioni può essere raggiunta anche mediante l'utilizzo di dessiccanti artificiali quali il gel di silice (fig. 24) che viene messo a contatto con i semi in contenitori ermetici. Mediante il suo potere di adsorbimento tale composto abbassa il contenuto di umidità interno dei lotti di semi fino a valori che garantiscono una loro conservazione a medio e lungo termine (Probert, *op. cit.*). Il quantitativo di dessiccante da impiegare varia a seconda della composizione dei semi, del quantitativo di materiale e soprattutto del loro contenuto in olii. In linea generale il rapporto semi/gel viene considerato nella misura di 1:1.



Figura 23 – Strumentazione per la misura dell'attività dell'acqua (a_w) in uso presso il M.A.I.Ch. (Creta). (foto: G. Bacchetta)

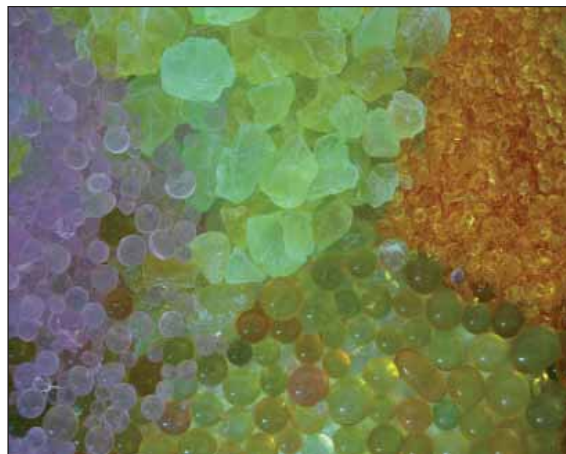


Figura 24 – Esempi di diverse tipologie di gel di silice autoindicante presenti sul mercato. (foto: E. Mattana)

7. IMBALLAGGIO E CONSERVAZIONE

Al fine di garantire uno stoccaggio di lunga durata è importante controllare e monitorare l'umidità che rappresenta il parametro più delicato per la buona conservazione dei semi. In effetti, uno stoccaggio a lungo termine non deve prevedere la necessità di una frequente manipolazione dei lotti di semi; per questo è necessario utilizzare dei contenitori perfettamente ermetici, ma anche trasparenti in modo tale da poter monitorare l'umidità presente al loro interno. Il controllo dell'umidità nel contenitore viene solitamente effettuato attraverso un indicatore (es.: gel di silice).

E' dunque fondamentale garantire la perfetta ermeticità ed integrità dei contenitori utilizzati per la conservazione a lungo periodo. A tal fine sono stati testati molteplici tipologie di contenitori (tab. 2) per valutare la loro efficacia comparandone vantaggi e svantaggi nel corso dello stoccaggio (Gómez-Campo, 2001). Sulla base di questi studi si è appurato che i contenitori utilizzabili sono fondamentalmente di tre tipi:

Tabella 2 – Vantaggi e svantaggi delle diverse tipologie di contenitori impiegati per la conservazione.

TIPO DI CONTENITORE	VANTAGGI	SVANTAGGI
Bustine in alluminio a tre strati	Diversi formati, leggeri, richiudibili, ermetici e occupanti poco spazio	Non visibilità del campione. Possibilità di danneggiamento dello stesso per pressione o compressione esterna.
Sacchetti in polietilene	Formato adattabile, trasparenti, leggeri, richiudibili e occupanti poco spazio	Durata molto breve (diventano porosi), perforabili dalle strutture esterne dei semi. Possibilità di danneggiamento dello stesso per pressione o compressione esterna.
Flaconi in vetro	Diversi formati, richiudibili (se chiusi a pressione), trasparenti ed ermetici	Pesanti, fragili, occupanti molto spazio

Per una conservazione sicura a lungo termine sono da preferire i flaconi in vetro trasparente con un indicatore di umidità all'interno che vira quando l'umidità relativa supera il 15%.

Per i semi molto piccoli si raccomanda di riporli in sacchetti permeabili all'aria, in polietilene, collocati a loro volta in flaconi ermetici in modo da non disperdere i semi all'interno del contenitore di vetro.

La chiusura dei flaconi in vetro può avvenire secondo differenti modalità; tra le più utilizzate c'è la chiusura alla fiamma (fig. 25) mediante saldatore ad ossigeno-propano (Gómez-Campo, *op. cit.*).

Nel tubo di vetro spesso si introduce anche un setto di sughero (fig. 25) che confina il germoplasma in un volume ridotto, evitando il danneggiamento dovuto alla manipolazione durante le operazioni di chiusura e collocazione nella cella per la conservazione a lungo termine. All'interno del tubo viene inoltre posizionata una targhetta plastificata che indica i dati relativi all'accessione e la data di confezionamento. Ciò potrebbe essere realizzato anche attraverso un codice a barre adesivo da posizionare esternamente alla provetta.

Le provette chiuse ermeticamente, al fine di valutarne la perfetta tenuta, vengono successivamente introdotte in un contenitore di vetro a chiusura pneumatica, contenente una soluzione satura di NaCl, che a temperatura ambiente favorisce un'elevata umidità relativa all'interno del contenitore. Dopo cir-



Figura 25 – Flaconi di vetro chiusi alla fiamma. (foto: G. Bacchetta)

ca quattro settimane sarà possibile verificare il non viraggio del gel di silice e quindi la perfetta chiusura e tenuta delle provette a garanzia della corretta conservazione dei semi.

Altri metodi prevedono l'impiego di flaconi in vetro (*vials*) con chiusura a pressione (guarnizione in gomma e guaina in alluminio) o a vite. Molto utilizzati sono anche i barattoli in vetro con chiusura a pressione e guarnizione in gomma (fig. 26).

Se la chiusura alla fiamma può garantire una condizione ermetica sicura, d'altro canto rappresenta un metodo altamente costoso, in quanto la sua lavorazione richiede un impiego di tempo notevole e inoltre le provette non possono essere riutilizzate.

La non perfetta chiusura ermetica dei contenitori può essere ovviata effettuando il test di tenuta prima dello stoccaggio e, ad ulteriore garanzia, utilizzando il sistema del doppio contenitore. I semi vengono inseriti all'interno di vials (di volume variabile, a seconda della quantità e della taglia dei semi, da 10 a 50 ml) chiuse ermeticamente a pressione con una guarnizione in gomma e guaina in alluminio.

Le *vials* a loro volta vengono posizionate all'interno di barattoli in vetro da 500 o 1000 ml chiusi a pressione. All'interno del barattolo può essere inserito, inoltre, un indicatore che rileva l'eventuale variazione di umidità (fig. 26).



Figura 26 - Vials in vetro con chiusura a pressione in uso presso BG-SAR al cui interno, per monitorare il contenuto di umidità, sono state inserite due capsule trasparenti in gelatina con gel di silice microgranulare e barattolo in vetro chiuso a pressione con una etichetta cartacea per il monitoraggio dell'umidità. (foto: E. Mattana)

Le operazioni di chiusura devono essere eseguite all'interno della camera di deidratazione, dove è necessario conservare i vari contenitori (completi di guaine e guarnizioni), nonché l'indicatore di umidità, in modo che tutto sia in equilibrio con i parametri di temperatura e umidità ottimali per la conservazione a lungo termine.

L'indicatore di umidità più diffuso ed utilizzato è il gel di silice granulare auto indicante (fig. 24). Questo gel è in grado di adsorbire l'acqua disponibile all'interno dei contenitori virando di colore. Il gel di silice è disponibile in commercio sfuso a diverse granulometrie e in bustine preconfezionate. Una alternativa all'impiego del gel di silice come indicatore è rappresentata da etichette cartacee dotate di aree impregnate di una soluzione di gel di silice che virano di colore a percentuali di umidità note (Fig.26).

7.1 Conservazione a lungo termine

Dopo aver confezionato ermeticamente i lotti di semi, questi possono essere stoccati per garantire una loro conservazione con una vitalità stimata in diverse decine di anni. Tutto ciò riguarda semi che consentono la deidratazione (semi ortodossi), mentre non c'è ancora la possibilità di conservare a lungo termine, in maniera sicura e garantita, i semi sensibili alla deidratazione (semi recalcitranti). Molte tecniche sono state sperimentate e testate ma, la trasposizione delle metodiche e dei risultati scientifici nelle normali procedure adottate dalle banche non è ancora avvenuta.

7.1.1 Congelazione

La congelazione secondo gli standard dell'*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) a temperatura di stoccaggio di -18°C o inferiore (IBPGR, 1985a) è un metodo efficace per prolungare la vitalità dei semi che devono essere conservati a lungo periodo. Ciò nonostante, va considerato che anche a tali temperature i processi enzimatici all'interno del seme non vengono completamente arrestati e conseguentemente una degradazione dello stesso, seppure lenta, risulta inevitabile.

Al fine di evitare danni da congelamento dell'acqua disponibile all'interno dei tessuti, per i semi voluminosi (es.: *Pancratium maritimum*) è necessario attendere diversi mesi prima di ottenere il livello ottimale di umidità che consenta la successiva tappa di congelazione.

La congelazione viene attuata attraverso normali strutture frigorifere di tipo commerciale o grazie all'ausilio di celle frigorifere appositamente realizzate. Nel primo caso i costi sono molto contenuti, così pure gli spazi d'ingombro e la manutenzione delle strutture stesse che possono essere posizionate all'interno delle camere di deidratazione (es.: Lombardy Seed Bank, Trentino Seed Bank). Questa soluzione viene solitamente preferita dalle banche di piccole dimensioni, perché consente la massima sicurezza a costi contenuti, avendo come unico limite la capacità di stoccaggio del germoplasma.

Le banche di medie e grandi dimensioni, tendono invece a privilegiare la realizzazione di celle frigorifere su misura con sistemi di raffreddamento e controllo più sofisticati e dispendiosi che consentono però di poter risolvere agevolmente i problemi di spazio e conseguentemente di affrontare con maggiore tranquillità la naturale espansione delle collezioni nel medio e lungo periodo (fig. 27).



Figura 27 – Interno della cella frigorifera a -25°C della Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR). (foto: C. Pontecorvo)

7.1.2 Liofilizzazione o ultradeidratazione

La liofilizzazione è un processo che permette di deidratare fortemente i semi fino a valori compresi tra 1 e 3%. Questa tecnica è stata oggetto di studio per la conservazione a lungo termine del polline al fine di ridurre la perdita di vitalità a partire dai primi anni ottanta (Schoenike *et* Bey, 1981; Cerceau *et* Challe, 1986).

In Francia questa tecnica è stata sviluppata presso il Laboratorio di Palinologia del Centro Nazionale della Ricerca Scientifica del Museo di Storia Naturale di Parigi. Al *Conservatoire Botanique National Méditerranéen* (CBNM) di Porquerolles, a partire dal 1987, i lotti di semi sono stati periodicamente inviati presso tale struttura per essere liofilizzati; dal 1992 l'acquisto di un liofilizzatore ha permesso di utilizzare questa tecnica direttamente a Porquerolles (fig. 28).

Come premessa alla descrizione delle tecniche di liofilizzazione occorre ricordare che in tutti i tessuti viventi l'acqua esiste sotto diverse forme. Inoltre va ricordato che l'acqua che interessa i processi di deidratazione è soltanto l'acqua libera distribuita negli spazi intercellulari e nei vacuoli citoplasmatici.

Poiché i tessuti da conservare sono destinati ad una rigenerazione, la dimensione dei cristalli di ghiaccio gioca un ruolo fondamentale; con una elevata velocità di congelazione si può avere, infatti, una semplice vitrificazione dell'acqua senza deterioramento dei tessuti cellulari. Quando la congelazione è completa, il materiale da deidratare viene sottoposto ad una pressione di 10^{-2} atmosfere al fine di assicurare il passaggio dell'acqua libera dallo stato solido a quello di vapore.

Considerando la diversità tra i semi, soprattutto a livello di tegumenti, dimensioni e quantità in acqua al momento della raccolta, è necessario individuare il metodo ed i tempi più adatti per la loro liofilizzazione.

L'obiettivo della sperimentazione di questa tecnica sui semi ortodossi è la valutazione del mantenimento della vitalità in confronto ad altre tecniche di conservazione quali lo stoccaggio a basse temperature.

A seguire viene illustrato il procedimento di liofilizzazione e il protocollo in uso presso il CBNM di Porquerolles. In un primo momento i semi raccolti vengono deidratati secondo le procedure classiche al fine di favorire la loro postmaturazione. In seguito a questa prima deidratazione vengono applicati due metodi per valutare il loro contenuto di umidità:

- Pesata prima e dopo la disseccazione in stufa a 104°C per 24 h di un campione definito di semi. La quantità d'acqua persa viene espressa in percentuale di peso.
- Pesata prima e dopo la liofilizzazione dei semi in un lasso di tempo definito (da 30' a 90 h). Nel momento in cui la variazione in peso diventa costante è possibile stimare che la perdita in acqua corrisponde al tenore in acqua libera dei semi. Il tempo di liofilizzazione riportato è il tempo minimo che favorisce questa perdita in acqua. Congiuntamente un test di germinazione con un campione di semi liofilizzati viene effettuato al fine di verificare il mantenimento in vitalità del lotto. Attualmente il tempo medio impiegato per la liofilizzazione è di circa 24 ore.

Gli studi effettuati presso il CBNM di Porquerolles sono stati condotti su 140 specie appartenenti a 20 famiglie (*Solanaceae*, *Saxifragaceae*, *Fabaceae*, *Liliaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Cyperaceae*, *Poaceae*, etc.) rappresentative della flora mediterranea francese.



Figura 28 – Liofilizzatore in uso presso il CBNM di Porquerolles. (foto: G. Bacchetta)

Sulla base dell'esperienza maturata si possono fare le seguenti considerazioni:

- una deidratazione troppo spinta può generare un leggero ritardo nel processo di germinazione, senza tuttavia danneggiare lo sviluppo delle plantule;
- per alcune specie si è constatato un miglioramento nella germinazione dei semi liofilizzati e stoccati a temperatura ambiente rispetto a testimoni non liofilizzati e conservati a +5°C o -20°C. Si tratta spesso di semi a tegumenti duri ed impermeabili;
- la liofilizzazione di semi identificati come “dormienti” non ostacola in alcun modo la germinazione;
- lo stoccaggio a temperatura ambiente dei lotti liofilizzati (fig. 29) permette di diminuire le spese di funzionamento legate all'energia elettrica senza osservare delle differenze in vitalità in rapporto ai lotti liofilizzati e mantenuti a +5°C.

Questa tecnica apre delle prospettive interessanti per la conservazione a lungo termine dei semi ortodossi. Attualmente presso il CBNM di Porquerolles sono conservati 1750 lotti di semi liofilizzati per un totale di 500 specie differenti. Gli studi comparativi di vitalità tra lotti liofilizzati e campioni conservati a -20°C, mostrano delle leggere differenze a favore dei lotti liofilizzati dopo 10 anni di conservazione. Questa tecnica, tuttavia, non è adatta per la conservazione di alcune specie. Uno dei vantaggi è che la messa in opera del processo di liofilizzazione consente di realizzare, nelle 48 ore successive, un test di vitalità o di germinazione. Questo test, comparato con un test iniziale, permette di individuare immediatamente gli eventuali effetti deleteri di questa tecnica e valutare, quindi, l'opportunità di impiegare questo processo di conservazione per la specie testata.



Figura 29 – Collezione di lotti liofilizzati presso il CBNM di Porquerolles. (foto: G. Bacchetta)

7.1.3 Crioconservazione in azoto liquido

La conservazione a lungo termine dei semi è stata favorita dall'applicazione di tecniche di crioconservazione, ossia lo stoccaggio del germoplasma alla temperatura dell'azoto liquido (-196°C). A queste condizioni i processi metabolici del seme, ed in particolare quelli enzimatici, si arrestano fondamentalmente a causa della mancanza di acqua allo stato liquido. In questo modo la vitalità del germoplasma può essere preservata per un periodo potenzialmente infinito. L'efficacia di questa tecnica, dimostrata in prove di laboratorio su numerose specie, ha portato diversi ricercatori a considerare la crioconservazione come l'unica tecnica attualmente disponibile in grado di assicurare una reale conservazione a lungo termine e affidabile in ogni situazione. Tale tecnica è indicata nel caso di alcuni semi recalcitranti, di specie che si propagano vegetativamente, di specie rare, minacciate o in pericolo di estinzione, così come di prodotti biotecnologici di alto livello come quelli costituiti dalle linee cellulari di estrazione farmacologica, cloni selezionati o materiale geneticamente modificato (Engelmann, 2004; González-Benito, 1998; Harvengt *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2005; Panis *et al.*, 2001).

Basi teoriche della crioconservazione

Un principio base della crioconservazione è che la possibilità della comparsa di danni durante la congelazione dipende dalla quantità di acqua libera nel sistema biologico e dalla sua capacità di cristallizzare durante il processo. La crioconservazione dei tessuti può aver luogo, pertanto, se si evita la formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio che potrebbero facilmente danneggiare la funzionalità e integrità delle membrane e degli organuli cellulari. In natura, alcune specie di piante hanno adottato dei sistemi che minimizzano la formazione di cristalli di ghiaccio a temperature sotto 0°C mediante sintesi di sostanze specifiche (zuccheri, prolina o proteine) che abbassano il punto di congelazione dei liquidi intracellulari ottenendo in tal modo quella che viene definita come la capacità di “superaffreddamento” (Atici *et* Nalbantoglu, 2003; Griffith *et* Yaish, 2004).

Senza dubbio quando si scende alla temperatura dell’azoto liquido la formazione di ghiaccio si può evitare attraverso la deidratazione intracellulare intensa e controllata delle strutture cellulari che si vanno a congelare mediante diversi meccanismi, il principale dei quali è la vitrificazione. La vitrificazione si riferisce al processo fisico di solidificazione non cristallina dell’acqua durante il quale si produce la transizione da una soluzione acquosa ad uno stato amorfo e vitreo (Panis *et al.*, *op. cit.*).

La crioconservazione in pratica

Lo svolgimento di un protocollo caratteristico di crioconservazione implica considerare le seguenti tappe:

- a.** pretrattamenti;
- b.** crioconservazione;
- c.** recupero post-congelamento.

Considerato che la crioconservazione può essere applicata ad ogni tipo di materiale biologico, dai semi fino agli apici meristemati, passando per cellule, calli, polline, embrioni somatici, etc., la necessità per cui nei protocolli specifici siano rappresentate tutte le fasi anteriori, dipenderà dal tipo di materiale da conservare.

- a.** Pretrattamenti. Consistono nelle manipolazioni del germoplasma prima di procedere alla crioconservazione che, seppur non migliorano il recupero post-congelamento, tuttavia incrementano la sopravvivenza del materiale quando vengono applicati in combinazione con altre strategie crioprotettive. I pretrattamenti più comuni comprendono: esposizione dei tessuti di piante di climi temperati ad un regime di acclimatazione fredda; applicazione di agenti osmotici che riducono il contenuto in acqua prima della congelazione o precoltivazione dei tessuti in substrati che contengano composti anti-stress come, per esempio, la prolina o l’acido abscissico (Benson, 1999).
- b.** Crioconservazione. Come detto precedentemente, la presenza di acqua risulta allo stesso modo pregiudiziale sia per la conservazione tradizionale che per la crioconservazione. Per questo motivo sono state predisposte diverse strategie di crioconservazione che cercano di ridurre al minimo l’umidità relativa dei tessuti o rendere l’acqua meno disponibile alla formazione di cristalli prima di procedere alla immersione in azoto liquido. La scelta di una determinata strategia sarà fondamentalmente condizionata dal tipo di materiale che si deve crioconservare (cellule, calli, apici meristemati, embrioni, tanto somatici quanto zigotici o semi).
 - Protocollo standard di crioconservazione. Questo è stato il primo protocollo sviluppato per tessuti vegetali idratati (Withers *et* King, 1980) e si basa su un lento raffreddamento iniziale dei campioni (a un tasso di 0,5-2°C min⁻¹) in presenza di una soluzione crioprotettiva che di solito contiene dimetilsolfossido (DMSO) a una concentrazione compresa tra il 5 e il 15%. Quando il materiale raggiunge una temperatura di -40°C si ritiene che la soluzione intracellulare sia suffi-

cientemente concentrata per vitrificare prima della successiva immersione in azoto liquido. Oggi questo metodo è stato in gran parte sostituito da altre tecniche alternative fondamentalmente per l'elevato costo delle strumentazioni necessarie al raffreddamento programmato. Ad ogni modo si continua ad utilizzare soprattutto quando si crioconserva materiale indifferenziato, quale sospensioni cellulari o calli.

- Deidratazione all'aria. E' il metodo più facilmente realizzabile e semplice per ridurre il contenuto in acqua dei tessuti idratati. Generalmente i campioni si asciugano sotto un flusso di aria sterile in cappa a flusso laminare; anche se quando si utilizza un metodo maggiormente riproducibile si ricorre all'introduzione del materiale vegetale in vials chiuse contenenti una quantità determinata di gel di silice (Uragami *et al.*, 1990). Questo metodo è direttamente applicabile a semi ortodossi, embrioni zigotici e al polline di numerose specie. Una metodologia di deidratazione ultra rapida è stata sperimentata con esito positivo per embrioni zigotici recalcitranti di alcune specie tra cui *Quercus robur* L. (Berjak *et al.*, 2000).
- Incapsulamento/deidratazione. Questo metodo venne sviluppato da Fabré *et al.* (1990) e rappresenta una variante del metodo della deidratazione all'aria pensato principalmente per essere applicato ad apici meristematici o embrioni zigotici o somatici. La tecnica consiste in primo luogo nella generazione di un "seme artificiale" (sia con un embrione zigotico o somatico che con un meristema) mediante l'incapsulazione in sfere di alginato di calcio. Questo si ottiene immergendo il materiale vegetale in una soluzione di alginato libero di calcio; successivamente materiale e soluzione vengono aspirati con l'aiuto di una pipetta e distribuiti in una soluzione di Ca^{2+} 100 mM. Il calcio determina la polimerizzazione dell'alginato intorno al germoplasma e la formazione della capsula di alginato. In seguito si procede ad una deidratazione osmotica consistente nella immersione delle capsule di alginato in una soluzione di saccarosio 0,75 M per 16-72 ore e quindi al trasferimento delle stesse sotto una corrente di aria sterile in una cappa a flusso laminare, o in gel di silice per 3-8 ore al fine di ridurre il loro contenuto in umidità (Benson, *op. cit.*).
- Vittrificazione. E' una tecnica utilizzata per la prima volta sulle piante da Uragami *et al.* (1989) che, come detto in precedenza, consiste nella sostituzione dell'acqua intracellulare con una soluzione vitrificante che eviterà la formazione di ghiaccio durante la sua transizione allo stato vitreo. Il processo generalmente inizia con la preparazione del germoplasma in un substrato arricchito con un agente crioprotettore come per esempio sorbitolo 1,2 M per 1-2 giorni. Successivamente il materiale si immerge nella soluzione vitrificante (PSV2, consistente in glicerolo al 30% (v/v), etilenglicolo al 15% (v/v), DMSO al 15% (v/v) e saccarosio 0,4 M) e si mantiene sotto ghiaccio per 20-120 minuti. Dopo il trattamento della vittrificazione il materiale vegetale viene direttamente immerso in azoto liquido. Questo schema di lavoro provoca la vittrificazione tanto intra quanto extra-cellulare (Benson, *op. cit.*; Engelman, *op. cit.*). Quindici anni dopo la sua pubblicazione il metodo della vittrificazione è di gran lunga il protocollo di crioconservazione più utilizzato. Probabilmente la riuscita di questo procedimento si può attribuire alla sua semplicità, alla alta riproducibilità e al fatto che può essere applicato con buoni risultati a una grande varietà di tessuti e di specie vegetali (Engelman, *op. cit.*).
- c. Recupero post-congelamento. Nel momento in cui si riporta il germoplasma a temperatura ambiente per riattivare il suo sviluppo, la crioconservazione ha poche precauzioni che debbono essere seguite. Generalmente il germoplasma si estrae dai contenitori criogenici in cui sono stati conservati in azoto liquido e si mette a bagno a 25-30°C o anche si lascia semplicemente a temperatura ambiente (Benson, *op. cit.*). Solo nel caso in cui il protocollo di crioconservazione utilizzato includa

la vitrificazione, il germoplasma trascorrerà un periodo previo di scarico della soluzione vitrificante una volta scongelato, a tal fine si mantiene, per esempio, in saccarosio 1,2 M per un'ora e successivamente lo si trasferisce in un ambiente fresco per la sua riattivazione.

Applicazione della crioconservazione al germoplasma

La crioconservazione può essere applicata a qualunque tipo di materiale biologico. Di seguito verranno spiegati alcuni dei progressi realizzati nel campo della crioconservazione di semi ortodossi e recalcitranti di piante rare, endemiche o minacciate.

I semi ortodossi (v. 6.9.1) si caratterizzano per il fatto che possono subire un processo di deidratazione che riduce considerevolmente il loro contenuto in umidità. Questi semi non presentano difficoltà per la loro conservazione nelle banche del germoplasma tradizionali, tuttavia la crioconservazione è stata applicata nei casi di semi aventi longevità limitata e/o di semi di piante rare o minacciate. In questo caso la tecnica della crioconservazione è semplice e non necessita di molto tempo né di particolari accorgimenti, dato che i semi vengono introdotti nelle *criovials* (fig. 30) di propilene e queste immerse direttamente in azoto liquido senza necessità di alcun pretrattamento.

Tale tecnica è stata testata con specie delle famiglie *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cistaceae* e *Scrophulariaceae* (González-Benito, *op. cit.*).

I semi recalcitranti (v. 6.9.1) sono caratterizzati da una elevata percentuale di umidità nei loro tessuti, dalla sensibilità alla deidratazione (che fa perdere la loro vitalità se scende al di sotto di certi livelli) nonché dalla difficile conservabilità. A tutto ciò si associa una considerevole sensibilità alle basse temperature. La crioconservazione ha affrontato recentemente il grave problema della conservazione dei semi recalcitranti ed ha messo a punto alcune possibilità per superare queste limitazioni. In questi casi la strategia che ha mostrato risultati più promettenti consiste nell'operare su embrioni, o assi embrionali isolati. Questo perché si è appurato che se il seme viene direttamente immerso in azoto liquido la sua sopravvivenza dopo la congelazione è praticamente nulla (Marzalina *et* Khrisnapillay, 1999). Gli embrioni sono strutture molto piccole, assai resistenti alla dissecazione e relativamente uniformi per dimensioni e contenuto in umidità (Fu *et al.*, 1993); pertanto possono essere sottoposti a una deidratazione crioprotettrice controllata (realizzata, per esempio, in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare) prima di essere introdotti in azoto liquido, sia direttamente sia dopo un raffreddamento progressivo. Esperimenti positivi in tal senso sono stati realizzati, per esempio, con varie specie di *Quercus*, genere che include specie con semi recalcitranti e di grande importanza negli ecosistemi temperati e mediterranei (González-Benito, *op. cit.*), *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* e *Shorea* (Marzalina *et* Krisnapillay, *op. cit.*).

Una alternativa molto promettente per la conservazione degli embrioni consiste nella incapsulazione seguita dalla deidratazione. In questo caso gli embrioni zigotici incapsulati vengono tenuti per diversi periodi di tempo su un substrato liquido con una elevata concentrazione di saccarosio, dopo ciò vengono parzialmente deidratati sotto cappa a flusso laminare o utilizzando gel di silice. In seguito vengono direttamente immersi in azoto liquido. Alcuni autori hanno sottolineato la particolare sen-

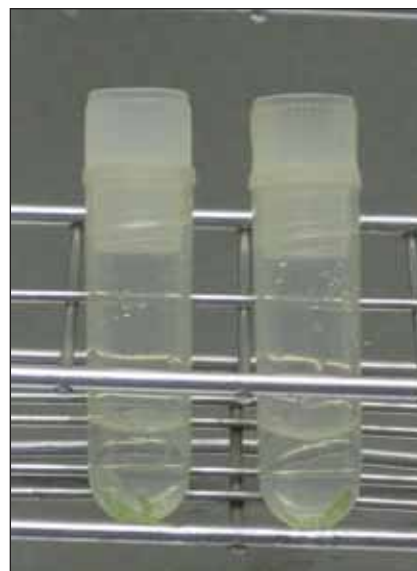


Figura 30 - Vials di polipropilene per crioconservazione (*criovials*). Si può notare il materiale vegetale (in questo caso gemme vegetative) immerso in una soluzione crioprotettrice prima della sua immersione in azoto liquido. (foto: J. Ramírez Luna)

sibilità dimostrata dagli embrioni di semi recalcitranti a manifestare risposte negative prima dell'estrazione, azione che presuppone la loro separazione fisica dal resto del seme (Benson *et al.*, 1996). Sebbene tale fenomeno sia stato osservato con maggiore frequenza in specie tropicali, i sintomi solitamente sono quelli di un rapido processo ossidativo che coinvolge fondamentalmente i composti fenolici, questi provocano un annerimento tanto dei tessuti quanto del substrato che li circonda e la conseguente inibizione della crescita che conduce alla morte delle cellule. In questi casi, tanto la deidratazione in saccarosio quanto la successiva disseccazione all'aria, sono le tecniche più comunemente utilizzate per evitare che gli embrioni patiscano questi fenomeni ossidativi deleteri.

Alcuni autori hanno anche ipotizzato l'aggiunta di carbone attivo nel substrato di recupero post-congelazione degli embrioni, tale tecnica si è mostrata molto efficace per assorbire composti fenolici potenzialmente tossici (Normah *et Marzalina*, 1996).

L'implementazione delle tecniche di crioconservazione ha avuto un ruolo fondamentale nei progressi della conservazione del germoplasma di piante rare o minacciate. Un esempio lo troviamo in alcune orchidee che corrono il rischio di estinzione come nel caso di *Bletilla striata* Rchb.f. (Hirano *et al.*, *op. cit.*). In questo caso sono stati crioconservati i semi immaturi di *Bletilla*, raccolti 4 mesi dopo l'impollinazione, con una percentuale media di umidità del 33%. Tale procedura è stata realizzata applicando un protocollo di pretrattamento e vitrificazione. Il pretrattamento consiste nel mantenere i semi, una volta raccolti, nel substrato "New Dogashima" (ND) (Tokuhara *et Mii*, 1993) solidificato con agar allo 0,2% e arricchito con 0,3 M di saccarosio. In tali condizioni i semi si conservano a 25°C per tre giorni sotto illuminazione continua, a una intensità di 62,0 mM m⁻² s⁻¹. Dopo questo pretrattamento i semi vengono sottoposti a un processo di vitrificazione che consiste nell'introdurli in *criovials* di 2,0 ml con la soluzione crioprotettrice (glicerolo 2 M e saccarosio 0,4 M su substrato ND) per 15 minuti a 25°C. Dopo questo tempo si elimina la soluzione e i semi si deidratano a 0°C per 2 ore con 2,0 ml di soluzione di vitrificazione PVS2, che contiene glicerolo al 30% (v/v), etilenglicolo al 15% (p/v) e dimetilsolfossido al 15% (p/v) su un substrato ND arricchito con 0,4 M di saccarosio e portato a pH 5,4 (Sakai *et al.*, 1990). Di seguito le *criovials* con i semi vengono direttamente immersi in azoto liquido.

7.2 Collezioni attive

Oltre al materiale destinato alla conservazione a lungo periodo (collezione di base) ogni banca deve garantire la disponibilità di lotti da utilizzare nel breve-medio periodo per interventi *in situ* (rinforzo di popolazioni o reintroduzioni) e semine dirette in campo, o per attività di conservazione *ex situ* quali rigenerazione, scambi attraverso *Index Seminum* e prove sperimentali per ricerche scientifiche. I lotti destinati a queste attività vanno a costituire la cosiddetta "collezione attiva". La modalità di conservazione più comunemente utilizzata è la refrigerazione; tale procedura consente di stoccare i campioni ad una temperatura compresa tra 0 e 10°C e non necessita di particolari strumentazioni frigorifere.

7.2.1 Semina

Il processo di produzione di piante è una tappa fondamentale nella conservazione delle specie la cui propagazione si realizza normalmente per via sessuale. Non serve la conservazione delle accessioni di semi di una data unità tassonomica se non si ha la capacità di riprodurre questo materiale. Nel

campo della conservazione, la produzione di piante risponde a diversi obiettivi, per esempio il rinforzo popolazionale come supporto alla conservazione *in situ*, o la creazione di nuove popolazioni o di collezioni vive *ex situ*; allo stesso modo, spesso è necessario disporre di piante per studi scientifici finalizzati al conseguimento di molteplici obiettivi.

Non si ha la pretesa di dare una descrizione esaustiva di metodologie e tecniche attualmente disponibili per la produzione di piante; la finalità di questo capitolo è quella di riassumere l'esperienza maturata nei casi in cui si dispone di una quantità di semi limitata, situazione frequente quando si opera con unità tassonomiche e/o popolazioni minacciate.

La casistica, in relazione a metodologie di semina e produzione di piante, è molto ampia visto che in funzione della specie le esigenze possono essere molto diversificate e i protocolli tendono sempre a essere specie-specifici. Ciò nonostante, in tutti i casi si tratta di utilizzare il substrato adeguato e mettere i semi nelle condizioni ambientali più idonee per favorire la germinazione e proteggere il materiale dagli agenti biotici o abiotici che possono determinare danni alla coltura (es.: agenti climatici, patologie, uccelli e piccoli mammiferi, etc.).

Tipologie di semenzai

In relazione all'ubicazione del semenzaio, è da preferire un sito in cui sia possibile il controllo della temperatura, dell'umidità e della luce, in considerazione del fatto che la germinazione rappresenta la tappa più delicata nello sviluppo della pianta. L'ideale è disporre di camere di crescita opportunamente isolate, dotate di sistemi di climatizzazione, con controllo dell'umidità, drenaggio adeguato e luce artificiale uniforme ove sistemare i vassoi e/o contenitori.

Come regola generale si lavora in serre, potendo variare molto i parametri ambientali a seconda del livello di automazione presente. Quando i semi a disposizione sono molto scarsi, si raccomanda l'utilizzo di camere di germinazione o di coltura (es.: fitotron).

Nel caso in cui non si disponga delle strutture e attrezzature sopra citate, si possono utilizzare dei banchi termoregolati (fig. 31), dispositivi molto economici attraverso i quali si ottiene un accettabile controllo climatico per numerose unità tassonomiche (Jiménez *et* Caballero, 1990). In situazioni estreme si può realizzare la semina all'aperto, in un ambiente quanto più possibile protetto dai diversi fattori meteorologici limitanti (es.: vento, elevata radiazione solare, gelate, etc.).

Le esigenze di ogni specie sono differenti: come regola generale si cerca di ricreare le condizioni più prossime a quelle dell'habitat naturale in cui la specie vegeta. Questo fatto presuppone che, quando si lavora contemporaneamente con diverse unità tassonomiche, non si possono concentrare tutti i semenzai in una stessa area del vivaio o della serra. Ad esempio per seminare *Anchusa littorea* Moris, *taxon* endemico delle aree costiere della Sardegna sud-occidentale, è opportuno posizionare il relativo semenzaio in un luogo esposto a luce solare diretta per numerose ore, mentre il semenzaio di *Anchusa formosa*, endemica delle montagne del Sulcis, dovrà essere ubicato in una posizione molto più ombreggiata e con temperature medie più basse. Per questo, in funzione del numero di entità da coltivare, si selezionano vari siti del vivaio de-



Figura 31 – Serra climatizzata con banchi termoregolati per la moltiplicazione di plantule. (foto: E. Mattana)

stinati ai semenzai, raggruppando le unità tassonomiche a seconda delle loro esigenze. Per esempio si metteranno insieme *Anchusa littorea* con entità tipiche della prima linea di costa del genere *Limonium* (anche se per quest'ultimo si utilizzerà un substrato diverso).

Per entità delle quali non si conoscono le esigenze ecologiche, è opportuno lavorare in condizioni di laboratorio, utilizzando le camere di germinazione (Thomson, 1979). In questo modo si potranno individuare con maggiore precisione le migliori condizioni per le entità in esame e arrivare così a stabilire dei protocolli di riproduzione adeguati (v. 10.2). Una volta ottenute le plantule non è consigliabile trasportarle direttamente in serra. Come passo intermedio, si consiglia una permanenza in laboratorio per 3-4 giorni al fine di osservarne l'evoluzione e lo sviluppo.

Contenitori per l'allevamento

Il mercato offre una vasta gamma di contenitori, per tipo e dimensioni; nel semenzaio si lavora fondamentalmente con vassoi/plateaux perforati o alveolati di diversa altezza e volume. Quando si lavora con piccole quantità di semi di entità differenti sorge la necessità di disporre di numerosi spazi di piccole dimensioni, utilizzando diversi tipi di plateaux e dimensione degli alveoli, sempre in funzione della specie. Nella maggior parte dei casi si utilizzano plateaux di plastica forati alla base (Vilarneau *et* Gonzalez, 1999) come semenzaio (fig. 32). Questo sistema consente la semina di un numero elevato di unità occupando una piccola superficie. In commercio si possono trovare plateaux riutilizzabili di plastica flessibile, particolarmente adatti a quelle entità i cui semi non vengono tenuti in coltivo per lunghi periodi di tempo; questi vassoi si degradano con relativa facilità per azione dei raggi solari e la loro manipolazione è poco pratica perché sono flessibili. Questi contenitori vengono forati per un drenaggio standard a seconda della specie.

In alternativa si consiglia di utilizzare plateaux per uso alimentare di plastica molto rigida, di diverse dimensioni, forandoli alla base per consentire il drenaggio. Il vantaggio di questi contenitori è dato dal fatto che non si rovinano eccessivamente al sole, sono facili da utilizzare grazie alla loro rigidità e consentono di ottimizzare gli spazi visto che si producono in una vasta gamma di dimensioni. In alcuni casi è molto più pratico utilizzare plateaux con alveoli. Per esempio, per specie del genere *Limonium* si utilizzano plateaux con alveoli di piccole dimensioni ($40/45\text{ cm}^3$); l'apparato radicale si adatta molto bene a una struttura di questo tipo e, trattandosi di un genere la cui percentuale di germinazione è molto elevata, praticamente si ottengono plantule in tutte le cavità.

In definitiva, come regola generale, si consiglia l'utilizzo di alveoli per specie o accessioni con alte percentuali di germinazione e con germinazione non scaglionata in modo tale da ottenere la massima omogeneità di sviluppo durante le prime fasi dell'allevamento con il minor numero possibile di contenitori vuoti.

La profondità del contenitore deve essere considerata molto attentamente quando si lavora con specie che raggiungono una certa dimensione, come quelle arboree, che passano un periodo nel semenzaio prima del loro travaso nei contenitori definitivi. In questi casi si utilizzano plateaux forati o alveolati, entrambi alti almeno 18 cm. Nel caso dei recipienti alveolati facili da manipolare, utilizzati comunemente per la semina di specie arboree con semi relativamente grandi, si consigliano quelli da 200 cm^3 per le conifere e 300 cm^3 per le caducifoglie a fusto unico (Ruano, 2003). Eventualmente, se la pianta rimane più tempo nel vivaio si consiglia il travaso in contenitori più grandi.

Sin dall'inizio dello sviluppo delle plantule è importante evitare le deformazioni dell'apparato radicale in quanto queste tendono a mantenersi creando problemi di stabilità nelle piante adulte; il problema risulta particolarmente grave nelle specie arboree che necessitano sempre di un buon ancoraggio. Molti contenitori attualmente in commercio, specialmente quelli destinati a piante forestali,

hanno dispositivi (es. canalette, fessure o rilievi che si sviluppano nel senso verticale delle pareti) che evitano la deformazione più grave ovvero la spiralatura delle radici.

Le radici delle piante allevate in contenitori poggiati direttamente sul suolo o su superfici impermeabili tenderanno a fuoriuscire creando occasioni di traumi e rotture in coincidenza degli spostamenti; l'impiego di aiuole sopraelevate, invece, favorisce la naturale *potatura* aerea delle radici e la migliore e più proporzionata conformazione radicale.

Tutti i contenitori devono essere disinfettati prima del loro uso e/o riuso. Generalmente si adopera una soluzione di acqua e ipoclorito di sodio nella quale vengono immersi per almeno 30 minuti; successivamente si risciacquano con acqua corrente.

Substrati

Non esiste un substrato standard, questo varia a seconda della specie che si semina. Si possono comunque fare alcune raccomandazioni generali: il pH del substrato dovrebbe essere leggermente acido con capacità tampone, dovrebbe mostrare buona ritenzione idrica e facilità di umidificazione, tessitura fine, bassa densità, alta porosità totale e buona capacità di aerazione, struttura stabile (in modo che non si contragga né espanda esercitando pressioni sui semi), privo di erbe infestanti, sostanze fitotossiche e parassiti, bassa salinità, elevato contenuto in sostanze organiche, bassa velocità di decomposizione e sufficiente livello di assimilazione dei nutrienti (Raymond, 1989).

Per *Silene cambessedesii* Boiss. et Reut., ad esempio il substrato più adeguato è composto da un 70% di sabbia silicea con granulometria variabile tra 2 e 3 mm, ed un 30% di terriccio universale in quanto si tratta di una specie che vegeta in zone psammofile costiere.



Figura 32 – Plantule di *Silene diclinis* (Lag.) Lainz, seminate in plateaux per uso alimentare. (foto: M. C. Escribà)

Semina e pratiche colturali

La semina consiste nel collocare i semi nel substrato; può essere realizzata utilizzando pinzette da laboratorio o mescolando il lotto di semi con sabbia fine sterile o talco per una migliore distribuzione. La profondità di semina deve essere uguale o minore del doppio della larghezza del seme (Besnier, 1989). Un sistema che da buoni risultati è quello di coprire il semenzaio con un sottile strato di sabbia sterile o vermiculite con l'obiettivo di impedire la disidratazione della parte superficiale e proteggerlo dalla incidenza diretta dei raggi del sole. Dopo la semina, si suole compattare leggermente con la mano il substrato per evitare ristagni o perdite di umidità.

L'irrigazione si farà sempre con acqua di qualità, pulita e con bassa salinità per evitare problemi di fitotossicità. Bisogna dotare il substrato di umidità costante anche prima della semina, mantenendolo al punto di saturazione ed evitando eccessi che potrebbero provocare infezioni fungine nocive per le radicle. E' vivamente consigliabile disporre di irrigazione nebulizzata; nel caso contrario, si devono idratare i plateaux dal basso per capillarità, al fine di evitare che cadano gocce sulle plantule, soprattutto in specie con foglie pelose che trattengono molta umidità.

La temperatura ottimale per lo sviluppo varia a seconda del *taxon*; si considera in genere adeguata una temperatura che oscilla intorno ai 20°C. Tuttavia molte specie di climi temperati hanno bisogno di marcate alternanze delle temperature, come avviene a fine inverno-inizio primavera, per poter dar luogo ai processi germinativi.

Sbalzi bruschi di temperatura possono causare danni molto gravi alla germinazione. Le temperature estreme per coltivare le piante vengono considerate attorno ai 35°C, a condizioni di temperatura superiori la capacità fotosintetica diminuisce considerevolmente. Questo deve essere tenuto in conto nelle serre o nei vivai. Quando si dispone di camere di crescita o di coltivazione, queste dovranno essere munite di sensori di allarme per temperature estreme.

Per numerose specie non si conoscono le esigenze di luce per la germinazione (intensità, durata del fotoperiodo, etc.). Risulta comunque chiaro che, avvenuta la germinazione, quando compaiono le foglie cotiledonari o le prime foglie caulinari, tutte le specie necessitano di luce. Durante la fase di crescita si devono evitare ombreggiamenti eccessivi che possono portare a ottenere piante filate.

La fertilizzazione delle plantule si effettua manualmente, quando si è già sviluppato il secondo paio di foglie caulinari. Non è conveniente effettuarlo nelle fasi precedenti per non produrre bruciature alle radichette. Si può utilizzare un fertilizzante convenzionale del tipo N-P-K 5-4-6 con microelementi. Si possono anche somministrare fertilizzanti a lenta cessione da incorporare durante la preparazione del terriccio. Questo tipo di fertilizzazione si impiega con ottimi risultati per l'allevamento di *Dianthus turoloensis* Pau et Pau e *Teucrium dunense* Sennen.

Solitamente non si realizzano trattamenti con erbicidi quando le plantule sono molto piccole; le erbe infestanti possono essere estirpate manualmente facendo attenzione a non danneggiare le radichette.

Il travaso è il momento in cui la plantula si toglie dal semenzaio e si colloca in un contenitore più grande, che sarà di diverso tipo in funzione della morfologia e delle dimensioni dell'apparato radicale e del tempo di coltivazione stimato. Il momento ottimale varia in ogni specie, poiché deve essere fatto quando la plantula è abbastanza consistente e vigorosa da tollerare la manipolazione. Per esempio, le plantule di *Carduncellus dianius* Webb con soltanto un paio di foglie caulinari hanno sufficiente consistenza e flessibilità per essere trapiantate; i semenzai di *Ononis tridentata* L. devono travasarsi con almeno 2 o 3 cm di altezza perchè l'attecchimento sia elevato.

Le plantule di altre specie, per avere una ripresa vigorosa devono travasarsi con 4-6 foglie caulinari come nel caso di *Silene diclinis* (Lag.) Lainz (fig. 32). Alcune specie possono rimanere per un lungo periodo nel semenzaio senza deperire come nel caso di *Teucrium lepicephalum* Pau.

Una modalità particolare per ottenere le plantule di alcune specie consiste nell'approfitte del materiale ottenuto dalla banca dei semi del suolo. Anche se non si consiglia come pratica abituale, questa può essere una via per individuare rapidamente protocolli adeguati di germinazione, per ottenere semi difficili da raccogliere con le metodologie convenzionali oppure per disporre di semi in uno stadio adeguato per la loro germinazione. Come esempio si può citare il caso di *Filago mareotica* Delile, i cui semi, estremamente piccoli, si conservano nel suolo e germinano nel momento in cui le condizioni sono ottimali.

In ambito mediterraneo, per limitare gli effetti negativi di elevata radiazione solare durante il periodo estivo, conviene proteggere le piante dalla luce solare diretta con ombreggi o strutture con teli ombreggianti di diversi tipi e diverse percentuali di ombreggio.

Durante tutto il processo dalla preparazione per la semina fino alla destinazione finale della pianta, si dovranno annotare in una scheda apposita (v. 13.14) tutte le attività realizzate e i risultati ottenuti, le condizioni e il luogo in cui si trova il materiale, oltre ad informazioni d'interesse.

7.2.2 *Index Seminum*

Il materiale utilizzato per gli scambi con gli altri enti di ricerca, attraverso *Index Seminum*, viene conservato in flaconi di plastica sigillati con parafilm o in bustine di alluminio a triplo strato o in materiale plastico contenenti un minimo di 20 semi e un indicatore di umidità. L'ente che riceverà il germoplasma sarà informato sulla provenienza, il trattamento a cui è stato sottoposto il materiale, i controlli effettuati e le condizioni ottimali di germinazione, attraverso una copia delle schede di campo e laboratorio relative all'accessione.

L'elenco delle singole accessioni disponibili per gli scambi e la loro quantità (in grammi e/o in numero di semi), dovrebbe essere resa disponibile e aggiornata periodicamente, attraverso pubblicazioni, notiziari, cataloghi, pagine web, etc.

La richiesta del materiale, chiamata anche *desiderata*, solitamente avviene attraverso la compilazione di appositi moduli, cartacei e/o elettronici, di cui ogni istituzione dispone. Costituiscono un valido esempio i moduli di richiesta semi della Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (<http://www.aimjb.org/>) e quello della Banca del Germoplasma della Sardegna (<http://www.ccb-sardegna.it/>).

Un elemento importante di riscontro e momento di collaborazione tra banche può essere rappresentato dallo scambio di informazioni sul materiale richiesto; in particolare la banca che riceve il germoplasma dovrebbe trasmettere una serie di informazioni relative ad ogni lotto di semi ricevuto, e in particolare:

- destinazione del lotto ricevuto (es.: Banca del germoplasma, collezione di semi, collezione di piante vive, ricerca, etc.);
- germinazione (percentuale, eventuali pre-trattamenti e condizioni di germinazione, numero di plantule ottenute);
- vitalità dei semi;
- eventuali dubbi di determinazione del *taxon*.

7.2.3 *Duplicazione delle collezioni*

Un'altra azione importante da implementare tra le istituzioni coinvolte nella conservazione *ex situ* è quella della duplicazione delle collezioni. In tal modo si può ottenere una maggiore sicurezza sulla disponibilità del germoplasma, anche nel caso in cui guasti tecnici o altri inconvenienti dovessero pregiudicare lo stato di conservazione delle collezioni custodite presso una banca.

Lo scambio del germoplasma, come stabilito ad esempio nell'ambito del progetto Interreg IIIB Genmedoc, avviene dopo la stipula di un apposito protocollo tra le istituzioni, nei modi che sono stati concordati tra le parti per quanto riguarda la quantità del materiale e il metodo di conservazione utilizzato.

Un punto fondamentale dello scambio è quello relativo alla proprietà del germoplasma. L'ente che invia il materiale rimane l'unico proprietario dello stesso e può in ogni momento chiedere che venga restituito, nel caso sussistessero delle esigenze per la conservazione *in situ*; l'ente ricevente è quindi solo un custode del germoplasma.

Lo scambio dei lotti di semi è vincolato al regime fitosanitario stabilito dalle competenti autorità nazionali e internazionali (v. 5.2.3).

7.3 Metodi di conservazione del polline

Per quanto attiene la conservazione del polline, è preferibile conservarlo in piccole aliquote invece che in un unico contenitore. Questo perché si può prendere la quantità necessaria senza interferire sullo stato di conservazione dell'intero lotto. Inoltre più limitata è la quantità conservata, più omogenee saranno le condizioni dei granuli.

Teoricamente il polline di ogni specie ha delle proprie condizioni ideali di stoccaggio, ma non tutti i granuli di polline possono essere conservati con le stesse tecniche (Hoekstra, 1995). Il contenuto di acqua del granulo e i carboidrati di riserva sembra siano le caratteristiche che più ne influenzano le modalità di conservazione (Pacini *et* Hesse, 2005). In particolare i granuli con alto contenuto di acqua come quelli delle *Poaceae*, si conservano con maggiori difficoltà (Barnabas *et* Rajki, *op. cit.*).

Qui di seguito sono elencati e descritti i più comuni metodi di stoccaggio:

- Conservazione a basse temperature e basse umidità relative. I recipienti dove conservare i granuli possono essere delle provette piccole, meglio se dei contenitori eppendorf di plastica che non devono essere sigillati. Le provette sono conservate all'interno di un essiccatore in cui la temperatura può essere mantenuta tra -20 e +4°C e l'umidità relativa inferiore al 10%. Per assicurare queste condizioni ambientali, si pone del gel di silice all'interno dell'essiccatore che viene mantenuto, a seconda delle temperature, dentro un frigorifero o un congelatore. Questo metodo è tra i più usati per la sua semplicità e permette di conservare il polline per un periodo massimo di alcuni mesi. Tuttavia questa metodologia non è consigliata per conservare il polline dei cereali o comunque pollini parzialmente idratati.
- Conservazione a basse temperature sotto vuoto. Questa metodologia prevede il rapido congelamento del polline a -60 -80°C e la graduale rimozione, non completa, dell'acqua per sublimazione. Dopo questo trattamento il polline deve essere mantenuto a temperature di poco sotto 0°C. Questo metodo consente di conservare il polline per lunghi periodi, anche per alcuni anni.
- Conservazione a bassissime temperature (crioconservazione). Con questo metodo il contenuto di acqua viene abbassato fino ad una determinata soglia e quindi il polline viene immerso e conservato in azoto liquido. Questo è il metodo più usato negli ultimi anni e consente una corretta conservazione a lungo periodo. A differenza dei due precedenti metodi può essere usato per il polline dei cereali, previa una lenta disidratazione a 20°C e 20-40% di umidità relativa.
- Conservazione in solventi organici. Questo metodo evita i problemi correlati al mantenimento di specifiche umidità relative, inoltre i granuli possono essere trasportati da un posto all'altro senza bisogno di essere conservati a basse temperature. Prima dello stoccaggio nei solventi più comuni (acetone, benzene, etere di petrolio, xilene, toluolo) il polline deve essere comunque disidratato. Si possono usare anche altri solventi ma questi influiscono sulla vitalità. Tale metodo è stato testato su poche specie e non è di uso corrente.

Indipendentemente dal metodo usato risulta critico il passaggio del polline conservato nelle condizioni sopradette alle condizioni ambientali o di laboratorio. Per questo se conservato a basse temperature lo scongelamento deve essere lento e deve prevedere anche una lenta reidratazione. Questo ultimo processo si effettua esponendo la provetta, o meglio, una superficie piatta su cui è stato disposto il polline, in un recipiente ad alta umidità relativa ottenuta grazie alla presenza di carta da filtro bagnata. Prima di utilizzare il polline conservato in qualsiasi modo è consigliabile verificarne la vitalità (v. 4.6.4)

7.4 Conservazione del materiale vegetativo

La conservazione del materiale vegetativo può essere un buon metodo, talvolta l'unico, per la conservazione di un genotipo, una unità tassonomica o una popolazione. Queste tecniche vengono adottate nel caso di popolazioni in grave pericolo di estinzione, di popolazioni o individui che non producono semi o ne producono una quantità esigua. Risulta essere molto utile quando si ipotizza una riduzione della variabilità genetica della discendenza rispetto alla generazione parentale (per esempio in popolazioni di *taxa* dioici con un numero di individui di sesso maschile molto ridotto), quando si vuole conservare un determinato genotipo che presenta caratteri peculiari o popolazioni i cui semi potrebbero essere stati fecondati con polline che non appartiene allo stesso individuo (introgressione con specie alloctone o con genotipi di provenienza non autoctona o sconosciuta). Inoltre è una buona strategia di conservazione per specie che si propagano molto facilmente per via agamica, come le *Salicaceae* (v. 10.3), o per specie con semi recalcitranti.

In linea di massima si può utilizzare una qualunque parte della pianta per la propagazione vegetativa. Tenuto conto delle metodologie di propagazione classiche, i materiali maggiormente utilizzati sono le talee erbacee e legnose, gli apparati radicali, i rizomi, i tuberi e i bulbi.

Di seguito ci si riferirà agli stadi della raccolta e alle possibilità di conservazione di questi materiali fino al momento della loro propagazione. La tecnica viene scelta in funzione della specie, dell'età della pianta madre, dei substrati disponibili e dalla tecnica di conservazione. In relazione alle piante dalle quali si preleva il materiale (piante madri o *ortets*) per fenomeni di toposisi e ciclofisi, in generale si ottengono risultati migliori nella propagazione quando queste piante sono giovani o quando si preleva il materiale dai giovani getti delle stesse.

Le talee legnose (fig. 33) sono molto utilizzate per specie caducifoglie (es.: *Salix*, *Populus*, *Tamarix*, *Laburnum*, *Cornus*, *Rosa*, *Ribes*, *Vitis*, etc.) perché si conservano per un periodo relativamente lungo e non richiedono solitamente trattamenti complicati nella fase di radicazione. Si prelevano durante la stasi del ciclo biologico della pianta, generalmente con legno del ciclo di crescita anteriore. Il materiale si taglia dalla porzione basale e centrale di rami vigorosi, ma con internodi di crescita moderata. Comunemente nel campo si raccolgono i rami interi e solo nei laboratori e nei vivai si producono le talee. Bisogna utilizzare forbici o cesoie ben affilate in modo da ottenere un taglio netto. Di solito si fa un taglio obliquo in una delle due estremità per indicare la polarità della talea, da tenere ben presente nel momento della piantagione.

Le dimensioni delle talee sono molto variabili a seconda della specie, però di solito sono lunghe da 10 a 20 cm, con diametro compreso tra 0,6 e 2,5 cm. Le talee devono avere come minimo due gemme in buono stato. Il taglio basale deve essere effettuato subito al di sotto di un nodo e quello superiore circa 2 cm oltre il nodo successivo. Questo tipo di talea può essere conservata mantenendo una elevata umidità, ma evitando la proliferazione di funghi, ad una temperatura compresa tra 0 e 5°C. Per le specie che radicano facilmente, come le *Salicaceae*, si può conservare direttamente il materiale in queste condizioni così come è stato raccolto sul campo e solo subito prima della messa a dimora



Figura 33 – Moltiplicazione per talea presso il CBNM di Porquerolles. (foto: G. Bacchetta)

provvedere a tagliare le talee. Il materiale viene conservato solitamente in mazzi, mantenendo la polarità delle talee, cioè con le parti basali tutte sullo stesso lato.

Le talee legnose per specie sempreverdi presentano di solito maggiori difficoltà di radicazione rispetto alle prime. Vengono raccolte di norma tra la fine dell'inverno e l'inizio della primavera o fine dell'estate a seconda della specie. Nel caso delle latifoglie sempreverdi si tagliano le foglie o parte di queste per evitare la loro disseccazione. Per il trasporto conviene tenerle avvolte in un panno umido e prepararle subito per il loro radicamento in un ambiente controllato.

Le talee non legnose (es.: *Myrtus*, alcune *Rosaceae*, *Acer*) o solo parzialmente lignificate (es.: *Eūnonymus*, *Erica*, *Calluna*, *Viburnum*, *Nerium*, *Rosmarinus*, *Santolina*, *Taxus*, *Prunus*, *Ilex*, *Lonicera*, *Rhododendrum*) vengono raccolte solitamente in primavera ed estate, devono essere protette dalla perdita di umidità e messe a radicare il più rapidamente possibile in un ambiente climaticamente controllato. La lunghezza di questo tipo di talee varia a seconda della specie: solitamente possono essere lunghe da 3 a 6 cm, arrivando al massimo fino a 10 cm.

Le talee radicali devono essere raccolte nel periodo di riposo vegetativo, generalmente alla fine dell'inverno o all'inizio della primavera. Durante la raccolta e il trasporto bisogna mantenere il materiale umido, avendo cura di marcare la polarità, come viene fatto per le altre talee. Per questo materiale non è possibile una conservazione e deve essere piantato subito in un ambiente controllato o senza protezione a seconda delle esigenze della specie. Si propagano con relativa facilità, tramite talee radicali, le specie dei generi *Acer*, *Populus*, *Malus*, *Rhus*, *Rosa*, *Rubus* e *Ulmus*.

Per le talee fogliari o le talee di gemme fogliari, solitamente di specie a foglie non decidue, è conveniente raccogliere in campo i rami per evitarne il disseccamento al quale sono molto sensibili. Le foglie selezionate per la propagazione devono essere sane e con crescita attiva, e nel caso di talee con gemme, queste devono essere ben sviluppate. Le talee devono essere tagliate, processate e piantate nel substrato adeguato per il loro radicamento il più velocemente possibile.

Nel caso di innesti a marza (o nesto), soprattutto nelle latifoglie, il materiale deve essere raccolto preferibilmente dalla porzione centrale e basale di rami vigorosi di un anno o meno che presentano gemme vegetative sane, evitando possibilmente l'apice e la zona di inserzione dei rami. In *Pinus* solitamente si innestano marze ottenute dalla zona distale dei rami dominanti con gemme vigorose. Nelle latifoglie caducifoglie il materiale può essere raccolto in qualunque momento dell'inverno e conservato, evitando la sua disseccazione, fino al momento dell'innesto. Nel caso dei pini il materiale si raccoglie di solito all'inizio della primavera e si innesta il più presto possibile; il materiale delle conifere può essere raccolto anche in estate, ma deve essere innestato immediatamente in ambiente controllato o subito dopo la raccolta nel caso che si innestino marze poco o non lignificate.

Per l'innesto con gemme, conviene selezionare gemme vegetative ben sviluppate. In campo si tagliano i rami e si eliminano le foglie alla cui inserzione si trova la gemma che si deve innestare, lasciando un pezzo di picciolo che faciliterà l'azione dell'innesto. Le gemme si estraggono immediatamente prima dell'innesto, che dovrà effettuarsi quanto prima. Il momento della raccolta del materiale dipende dalla specie, ma anche dalle condizioni climatiche, cosicché in zone calde o in serra si può utilizzare l'innesto di gemme in attività (primavera), mentre invece in ambienti freddi si devono usare gemme a riposo prese tra luglio e settembre. In questo tipo di materiale per innesti, come negli altri casi, bisogna evitare il disseccamento avvolgendolo in carta o panno umido durante il trasporto.

Un caso particolare è costituito dalla raccolta di materiale di piante bulbose. Solitamente il momento più idoneo è quello del riposo, in estate o in inverno a seconda della specie, quando la parte epigea è completamente secca. I bulbi vengono estratti manualmente o con l'ausilio di una zappa o altri

materiali da giardinaggio. Nel laboratorio o vivaio vengono lavati, disinfettati con fungicidi e lasciati asciugare all'ombra. Successivamente vengono tagliate le radici, puliti dalla terra ed eventualmente si separano i bulbilli. L'umidità più adeguata per la conservazione dei bulbi dipende dalla specie; alcune non tollerano la disseccazione, in particolare i bulbi squamosi (es.: *Lilium*), che devono essere conservati su sabbia, vermiculite, segatura, torba o qualunque altro materiale che mantenga un certo tenore di umidità. In generale, i bulbi con tuniche (es.: *Narcissus*) si conservano bene in buste di carta in ambiente areato e fresco, al riparo da temperature estreme fino al momento della loro moltiplicazione. Si consiglia il trattamento del materiale vegetativo con fungicidi; nel caso di bulbi e talee lignificate il trattamento si effettua, a titolo preventivo, prima o durante la conservazione, mentre in strutture non lignificate o radici, che generalmente non tollerano un periodo prolungato di conservazione, il trattamento si realizza nel momento della propagazione o nel periodo di radicazione. In tutti i casi è indispensabile fare attenzione a che il materiale sia perfettamente etichettato dal momento della raccolta fino alla fase di propagazione.

Per una descrizione dettagliata dei diversi metodi di propagazione, si consiglia comunque la consultazione di opere più specifiche quali Hartmann *et* Kester (1983) e MacDonald (1987). Il caso particolare della propagazione delle *Salicaceae* viene trattato in modo dettagliato nel paragrafo 10.3, visto che tale famiglia include un gran numero di specie strutturali della vegetazione ripariale e che alcune tra queste, come *Populus nigra*, sono in talune regioni minacciate e per tale motivo la loro conservazione deve essere considerata un obiettivo prioritario.

8. GERMINAZIONE

I test di germinazione sono necessari per una corretta gestione delle accessioni presenti in una banca del germoplasma. Tali prove possono avere diverse finalità: in primo luogo portare all'elaborazione di un protocollo efficace per il *taxon*, per la banca stessa o per un'altra banca. Questo protocollo sarà essenziale per arrivare, in un secondo momento, a monitorare la qualità dei lotti di semi conservati. Un'altra finalità della messa a punto del protocollo di germinazione per una specie è quella di poterla coltivare in vivaio e permettere alle plantule di completare il proprio ciclo fenologico. Talvolta può capitare che le condizioni ottimali di germinazione in laboratorio non coincidano con i risultati sperimentali in campo e la coltura delle specie moltiplicate. Tali discrepanze metodologiche spesso sono imputabili a cause contingenti e possono dipendere dal variare delle temperature, del fotoperiodo e del substrato, oltretutto dalle precipitazioni e dalle condizioni di umidità relativa.

8.1 Definizione di germinazione

A livello fisiologico la germinazione è un insieme di avvenimenti che inizia con l'imbibizione del seme e l'attivazione dei suoi processi metabolici pregerminativi, continua con l'allungamento della radichetta e termina con la rottura dei tegumenti del seme.

Da un punto di vista pratico e soprattutto osservabile in laboratorio, si definisce come germinazione la rottura dei tegumenti determinata dall'allungamento della radichetta o, in assenza di tegumenti, il visibile allungamento della stessa (Côme, 1970). L'obiettivo della germinazione è quello di far nascere una plantula a partire da un seme vitale che si trova nelle condizioni ottimali per passare dalla vita latente alla vita attiva (Musmarra, 1996). I Metodi ufficiali di analisi per le sementi (Ministero Agricoltura e Foreste, 1993) segnalano che lo scopo della prova di germinazione in laboratorio è quello di determinare la percentuale in numero di semi puri capaci di produrre plantule normali, potenzialmente in grado di svilupparsi in piante normali in condizioni favorevoli di coltura. Tale definizione sostanzialmente coincide con quella dell'*International Seed Testing Association*, che testualmente recita: “la germinazione di un seme nell'ambito di un test di laboratorio è l'emergenza e lo sviluppo di una plantula fino ad uno stadio in cui l'aspetto delle sue strutture essenziali indica la capacità o meno di svilupparsi ulteriormente in una pianta soddisfacente in condizioni di coltura favorevoli” (ISTA, 2004). Per ottenere la germinazione è necessario che vengano rispettate una serie di condizioni:

- Il seme deve essere vitale, maturo e non dormiente; nel caso sia dormiente bisogna eseguire i pretrattamenti necessari a eliminare le inibizioni alla germinazione (v. 8.3 e 8.4);
- Il seme deve essere posto nelle condizioni ambientali controllate relativamente ad acqua, temperatura, ossigeno e luce.

8.2 Fattori ambientali e germinazione

Di seguito vengono specificati i principali fattori ambientali che determinano l'avvio del processo di germinazione e influenzano le fasi successive alla stessa.

8.2.1 Acqua

Deve essere allo stato liquido; i bisogni in acqua sono variabili da specie a specie.

Esiste una quantità d'acqua che non deve essere superata viceversa la germinazione sarà inibita. Infatti in questo caso l'embrione entra in condizioni di anossia. D'altra parte per alcuni semi (es.: piante acquatiche, giunchi, riso) la germinazione ha luogo soltanto nel caso in cui siano completamente immersi. Parimenti se i tegumenti sono impermeabili all'acqua la germinazione non avrà luogo.

La reidratazione dei semi spacca i tegumenti al fine di consentire la crescita della radicola. Nelle condizioni naturali l'acqua del suolo non è utilizzabile nella sua totalità; a seconda della sua natura l'acqua è infatti più o meno trattenuta dai colloidi del suolo. I semi sviluppano una forza che deve contrastare la ritenzione dell'acqua dal suolo. Un aumento della pressione osmotica del suolo ostacola considerevolmente la germinazione (per esempio l'aggiunta di NaCl nell'acqua di imbibizione può rallentare considerevolmente la capacità germinativa di una specie). A questo scopo, durante la conduzione di un test di germinazione in laboratorio, l'impiego di acqua distillata o demineralizzata consente di avere condizioni riproducibili.

8.2.2 Temperatura

Deve essere compatibile con le esigenze della specie, agisce sulla velocità delle reazioni biochimiche e anche sulla velocità di germinazione. Una temperatura non adeguata può anche indurre delle dormienze di tipo secondario.

Condurre la germinazione a temperatura costante o con regime alternato può fornire risultati diversi sia come numero totale di semi germinati sia in relazione alla velocità del processo. Le esigenze termiche sono variabili a seconda delle specie e della loro origine geografica: alcune specie possono richiedere temperature molto basse (es.: 5°C per *Tulipa* e *Fagus sylvatica*) oppure elevate. L'ampiezza dell'intervallo delle temperature ottimali può variare con la specie e con il grado di dormienza del seme.

Infine, l'interazione con l'ossigeno e l'assenza o presenza di luce durante la germinazione esige un rigore esemplare nella conduzione della prova per individuare le caratteristiche germinative di una specie.

8.2.3 Ossigeno

A seconda delle specie, il bisogno di ossigeno è variabile. Esistono dei tenori ottimali per una germinazione massima. Solo l'ossigeno disciolto nell'acqua d'imbibizione è utilizzato dall'embrione per i suoi bisogni metabolici. Questo gas è poco solubile in acqua, essendo la solubilità inversamente proporzionale alla temperatura. Si tratta pertanto di uno dei parametri più difficili da controllare (richiede strumenti particolari) in un laboratorio di una banca del germoplasma. Tuttavia, non bisogna trascurare l'effetto di questo elemento durante le prove per la definizione di un protocollo di germinazione efficace.

8.2.4 Luce

La luce favorisce la germinazione della maggior parte dei semi che vengono pertanto definiti a fotosensibilità positiva. Altri invece non germinano che al buio (es.: *Cyclamen*) e sono perciò definiti a fotosensibilità negativa; altri ancora risultano indifferenti.

Il meccanismo della fotosensibilità è stato oggetto di numerosi studi condotti da Baskin *et al.* (1998) che hanno portato alla scoperta di un sistema fotorecettore: il fitocromo. Tale sistema è costituito da un pigmento localizzato nell'embrione. La fotosensibilità è apprezzabile con l'impiego di luce bianca su semi intatti e freschi. Questa fotosensibilità può scomparire a seguito della conservazione al secco e nel momento in cui gli embrioni vengono isolati dai tegumenti, da cui deriverebbe che tale sensibilità è dovuta ai tegumenti stessi (Côme, *op.cit.*). L'influenza della luce sulla germinazione di numerose specie mediterranee è stata studiata anche da Thanos (Thanos *et al.*, 1991; Thanos *et al.*, 1994; Thanos *et al.*, 1995).

Prova sperimentale per determinare la sensibilità alla luce

La caratteristica essenziale delle risposte regolate dal fitocromo è la loro reversibilità: vengono attivate da lunghezze d'onda di 660 nm (Rosso chiaro, RC) e inibite o bloccate da lunghezze d'onda di 730 nm (Rosso scuro, RS).

Scopo della prova è mettere in evidenza la reversibilità dell'induzione alla germinazione della luce. Gli acheni di lattuga (*Lactuca sativa* L.) hanno una fotosensibilità molto marcata che ha permesso di individuare il fenomeno. A seguire viene presentato il protocollo, elaborato a partire da questa sperimentazione.

1 – I filtri.

Il dispositivo permette di realizzare differenti tipi di illuminazione senza ricorrere ad una camera oscura. Questo dispositivo è costituito da due filtri e da un panno nero inseriti in due tubi concentrici in PVC. Il primo tubo (filtro rosso) consente di creare una illuminazione RC, la sovrapposizione del secondo tubo (filtro blu) permette di ottenere una illuminazione RS e la sovrapposizione del panno nero sui due filtri determina l'oscurità. E' importante verificare, prima di iniziare il test, di poter disporre di 12 dispositivi completi (ciascuno dotato dei due filtri e del panno).

2 – Preparazione delle capsule Petri.

Disporre 2 o 3 fogli di carta da filtro in 12 capsule da 36 mm. Umidificare abbondantemente con acqua distillata. Nei coperchi delle capsule contare 10 acheni. Quando i 12 lotti sono pronti, mettere gli acheni sulla carta da filtro e coprire immediatamente con i due filtri ed il panno per evitare una esposizione alla luce bianca.

3 – Esposizione degli acheni.

Porre le 12 capsule, coperte dai filtri e dal panno sotto i tubi fluorescenti. Saranno realizzate 2 prove da 6 repliche.

- Influenza del tempo di esposizione alla luce RC. Levare i panni neri dalle sei capsule e esporre per due ore alla luce con i due filtri sovrapposti (illuminazione RS). Per realizzare l'illuminazione RC è sufficiente levare il filtro blu per 0, 5, 10, 20, 40 e 60 secondi non dimenticando di riporre sia il filtro che il panno al termine del tempo di esposizione.
- Influenza del tempo di esposizione alla luce RS. Levare il panno nero dalle sei capsule rimanenti e esporre per 30 minuti con i due filtri sovrapposti (illuminazione RS). Levare quindi i sei filtri blu per 5 minuti (illuminazione RC). Rimettere il filtro blu (illuminazione RS) per tempi variabili: 0, 2, 4, 10, 30 e 60 minuti. Non dimenticare di riporre il panno nero alla fine della esposizione RS.

4 – Germinazione.

Lasciare le 12 capsule ricoperte dai due filtri e dal panno nero per 2-5 giorni a temperatura ambiente e contare il numero di acheni germinati per capsula. Rappresentare le due prove sotto forma di due curve di germinazione:

- prova 1: % di germinazione in funzione del tempo di esposizione a RC
- prova 2: % di germinazione in funzione del tempo di esposizione a RS.

8.3 Ostacoli alla germinazione: le dormienze

Dopo aver raggiunto la sua maturità morfologica, il seme si trova in uno stato di vita rallentata; per il suo ritorno alla vita attiva è necessario che le condizioni esterne siano favorevoli e che abbia raggiunto la sua maturità fisiologica. In molti casi non si hanno dormienze, la maturità morfologica e la maturità fisiologica sono raggiunte nello stesso momento. Al contrario se la maturità fisiologica viene raggiunta più tardi i semi vengono definiti “dormienti”. La dormienza è quindi lo stato fisiologico nel quale si trovano un seme o un embrione che, pur in condizioni favorevoli alla germinazione, sono incapaci di germinare (Côme, *op. cit.*).

Molti autori hanno definito i tipi di dormienza, ottimi studi si debbono a Baskin *et* Baskin (1998), a Côme (1970) ed a Côme *et* Corbineau (1992), ma, perché semplice, si propone la classificazione di Nikolaeva (1969) che individua due grandi gruppi di dormienza: di tipo endogeno e di tipo esogeno. Nelle prime è solitamente coinvolto l’embrione, mentre nelle seconde solo alcune strutture (endocarpi legnosi, tegumenti seminali, endosperma, etc.) che lo circondano, ad impedirne la germinazione. Quando la causa della non germinazione risiede nei tegumenti, si parla anche di inibizione tegumentale (Côme, *op. cit.*). Gli inibitori tegumentali sono principalmente costituiti da sostanze aromatiche o composti fenolici (es.: *Apiaceae*). Spesso i tegumenti stessi possono costituire un fattore di inibizione della germinazione ostacolando l’imbibizione e gli scambi gassosi (es.: *Fabaceae*) o impedendo la fuoriuscita della radichetta (es.: *Prunus* sp. pl.).

Possono esserci, inoltre, combinazioni di dormienze endogene. Le cause specifiche che impediscono la germinazione, nell’ambito delle dormienze endogene o esogene e le condizioni per rimuoverle sono illustrate in tab. 3. Se ci sono più cause che inducono la dormienza (combinazione di dormienze), per ognuna di esse ci sarà bisogno di un particolare pretrattamento.

Tabella 3 – Dormienze endogene ed esogene e pretrattamenti per rimuoverle.

TIPI DI DORMIENZA	CAUSE	CONDIZIONI CHE LA INTERROMPONO	ESEMPI
DORMIENZE ESOGENE	FISICA (A ₁)	impermeabilità dei tegumenti seminali all’acqua	scarificazione <i>Astragalus maritimus</i> Moris <i>Astragalus verrucosus</i> Moris <i>Robinia pseudoacacia</i> L. <i>Laburnum anagyroides</i> Medik. s.l.
	CHIMICA (A ₂)	presenza di fattori inibitori nel pericarpo (non frequente), talvolta all’esterno del frutto	rimozione del pericarpo, in alcuni casi con dilavamento <i>Ferula loscosii</i> (Lange in Willk. <i>et</i> Lange) Willk. <i>Fraxinus chinensis</i> Roxb. ssp. <i>rhynchophylla</i> (Hance) A.E. Murray <i>Acer pseudoplatanus</i> L.
	MECCANICA (A ₃)	resistenza meccanica dei tegumenti seminali alla crescita dell’embrione	rimozione del tegumento <i>Euphorbia graminifolia</i> Vill. <i>Elaeagnus angustifolia</i> L.

Segue

Segue - Tabella 3 – Dormienze endogene ed esogene e pretrattamenti per rimuoverle.

TIPI DI DORMIENZA	CAUSE	CONDIZIONI CHE LA INTERROMPONO	ESEMPI
DORMIENZE ENDOGENE	MORFOLOGICA (B)	incompleto sviluppo dell'embrione; compare solo combinata ad altri fattori	estivazione <i>Acis nicaeensis</i> (Ardoino) Lledo, A.P. Davis <i>et</i> M.B. Crespo
	FISIOLOGICA (C)	meccanismi fisiologici di inibizione della germinazione	
	FISIOLOGICA LEGGERA (C ₁)	brevi periodi di vernalizzazione, sostanze stimolanti della crescita	<i>Linaria arcusangeli</i> Atzei <i>et</i> Camarda <i>Betula pubescens</i> Ehrh.
	FISIOLOGICA INTERMEDIA (C ₂)	lungi periodi di vernalizzazione, gibberelline	<i>Nothofagus obliqua</i> (Mirb.) Oerst.
	FISIOLOGICA PROFONDA (C ₃)	vernalizzazione molto prolungata	<i>Sorbus aucuparia</i> L.
COMBINAZIONI DI DORMIENZE ENDOGENE MORFO-FISIOLOGICHE	(B+C)	generalmente lunghi trattamenti termici con alternanza di temperature	molto frequente nelle <i>Rosaceae</i>
	(B+C ₃)	lunga estivazione seguita da lunga vernalizzazione	<i>Fraxinus excelsior</i> L. Alcune provenienze di <i>Vitex agnus-castus</i> L. <i>Paeonia</i> sp. pl.

Se durante il test di germinazione o dopo la semina i semi non più dormienti (perché già sottoposti a un pretrattamento per eliminare le dormienze, v. 8.4) sono esposti a condizioni ambientali sfavorevoli (alta temperatura, anossia, eccesso d'acqua, etc.), possono attivarsi dei meccanismi fisiologici di blocco della germinazione (Côme *et* Corbineau, *op. cit.*). Il risultato sono le cosiddette “dormienze indotte o secondarie”, chiamate così per differenziarle dalla “dormienza primaria” (quella esibita al momento della disseminazione).

Molto spesso i semi soggetti a dormienza secondaria prediligono per germinare cicli giornalieri di temperature fortemente alternate, come avviene a fine inverno-inizio primavera (notte fredde e giorni caldi). In questi casi, le semine tardive che trovano il terreno troppo ‘caldo’ possono provocare dormienza secondaria e, quindi, mancata germinazione.

8.3.1 Metodo pratico per determinare il tipo di dormienza su semi non sottoposti a deidratazione

Nel caso in cui, a seguito di diverse prove sperimentali, si ottengano valori bassi di germinazione è indispensabile ricercare le possibili cause di tali risultati negativi. Queste possono essere riconducibili sia alle diverse tipologie di dormienza sia alla scarsa vitalità del lotto di semi. Per determinare se il germoplasma in esame presenta una qualche forma di dormienza è possibile procedere secondo il seguente schema:

- eseguire i test su materiale fresco;

- determinare se si tratta di semi ortodossi o recalcitranti (Hong *et* Ellis, 1996);
- esaminare la struttura dei semi (Martin, 1946) e verificare che i semi siano ben formati;
- far germinare al buio, a temperature comprese tra 0 e 30°C, i semi interi e gli embrioni nudi ed analizzare i risultati ottenuti (fig. 34);
- se necessario, valutare l'esistenza di fotosensibilità positiva o negativa utilizzando semi interi ed eseguendo prove di germinazione alla luce e a temperature elevate (20-30°C);
- verificare la presenza di composti fenolici nei tegumenti;
- verificare la presenza di impermeabilità all'acqua;
- determinare l'effetto di trattamenti particolari quali freddo umido, conservazione a secco e GA3;
- verificare l'effetto dell'ossigeno.

Se, a seguito di queste verifiche, il numero dei semi germinati risulta scarso o inferiore al 50% ma i tessuti sono ancora integri, è bene sottoporre i semi a test di vitalità (es.: test colorimetrico al tetrazolio).

Qui di seguito (fig. 34) si esemplificano le diverse possibili risposte di semi interi ed embrioni nudi sottoposti a prove di germinazione condotte in un vasto range di temperature. Questi test possono mettere in evidenza la presenza ed il tipo di eventuali dormienze. Un altro approccio per identificare il tipo di dormienza presente in un lotto o in una specie di cui non si hanno notizie in merito è descritto nel punto 10.2. In questo caso le esigenze ecofisiologiche per la germinazione sono individuate attraverso la simulazione dei cicli stagionali caratteristici nell'areale di distribuzione della specie di interesse.

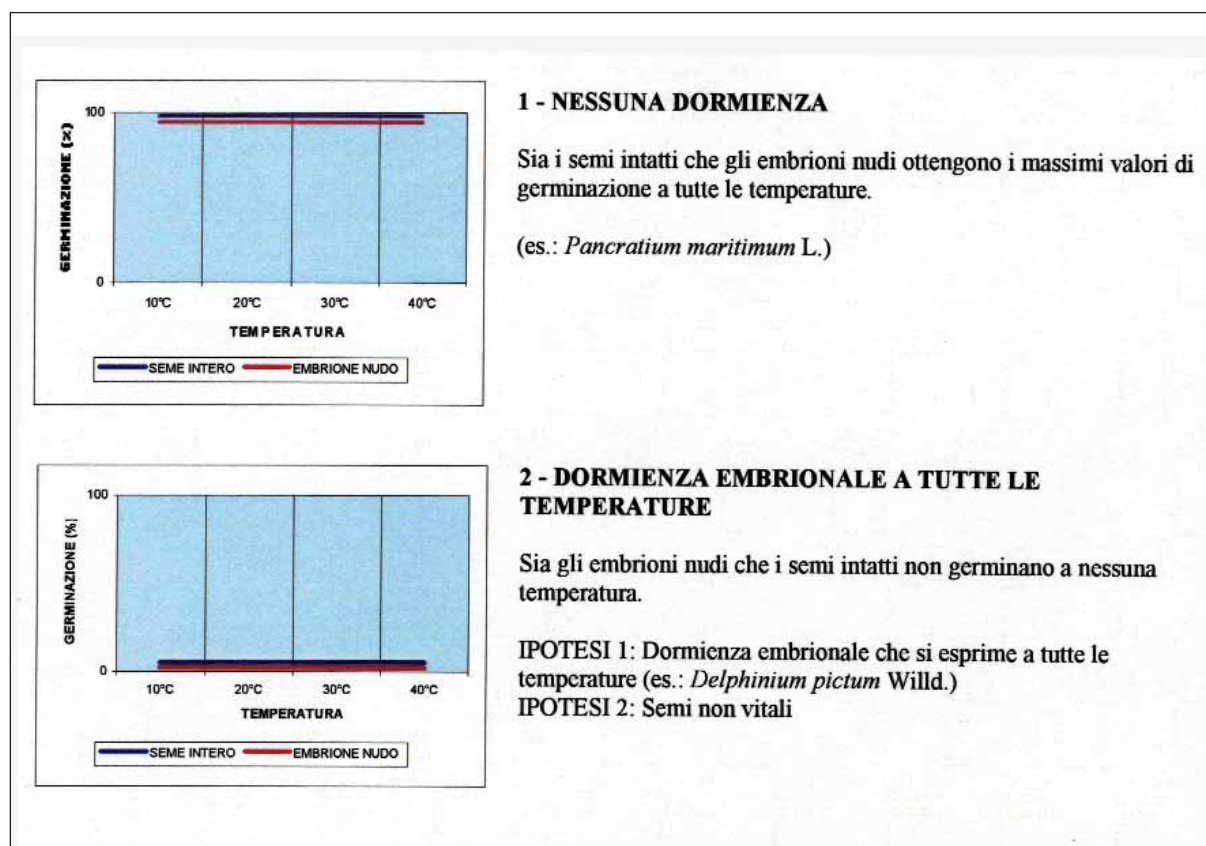
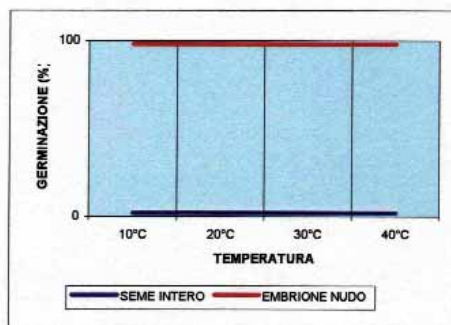


Figura 34 - Comportamenti di semi interi e di embrioni durante le prove di germinazione condotte per identificare la presenza ed il tipo di eventuali dormienze. - Segue

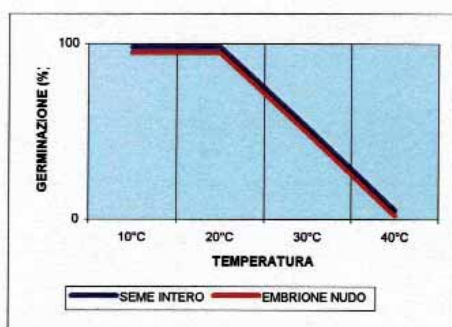


3 - NESSUNA DORMIENZA EMBRIONARIA INIBIZIONE TEGUMENTARIA A TUTTE LE TEMPERATURE

Gli embrioni nudi germinano a tutte le temperature, mentre i semi intatti non germinano a nessuna temperatura; risulta quindi evidente che le cause della dormienza devono essere ricercate a livello tegumentario.

IPOTESI 1: Tegumenti duri (es.: *Fabaceae*)

IPOTESI 2: Fotosensibilità positiva (es.: *Lactuca* sp. pl.)

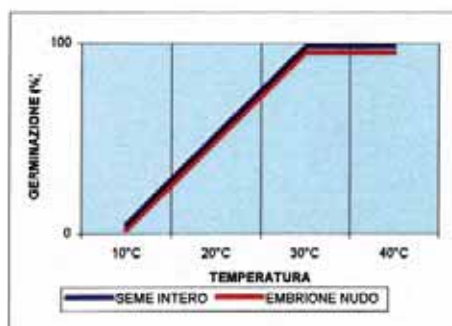


4 - NESSUNA INIBIZIONE TEGUMENTARIA DORMIENZA EMBRIONALE CHE SI MANIFESTA AD ALTE TEMPERATURE

Dormienza embrionale che si attiva ad alte temperature.

IPOTESI 1: Si tratta di specie di climi temperati (es.: *Primula* sp. pl.)

IPOTESI 2: Dormienza embrionale eliminabile con trattamento a freddo (es.: *Taxus baccata* L.)

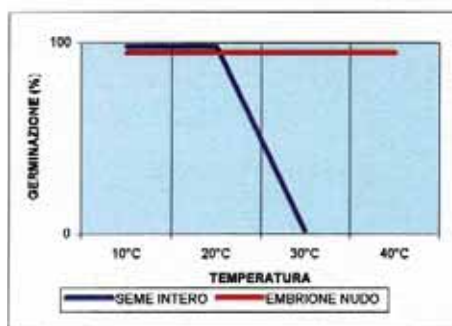


5 - NESSUNA INIBIZIONE TEGUMENTARIA DORMIENZA EMBRIONALE CHE SI ESPRIME A TEMPERATURE BASSE

I tegumenti non ostacolano in alcun modo la germinazione in quanto le curve sono identiche, si manifesta una dormienza a livello embrionale alle basse temperature.

IPOTESI 1: Specie di climi caldi (es.: *Chamaerops humilis* L.)

IPOTESI 2: Specie tropicali



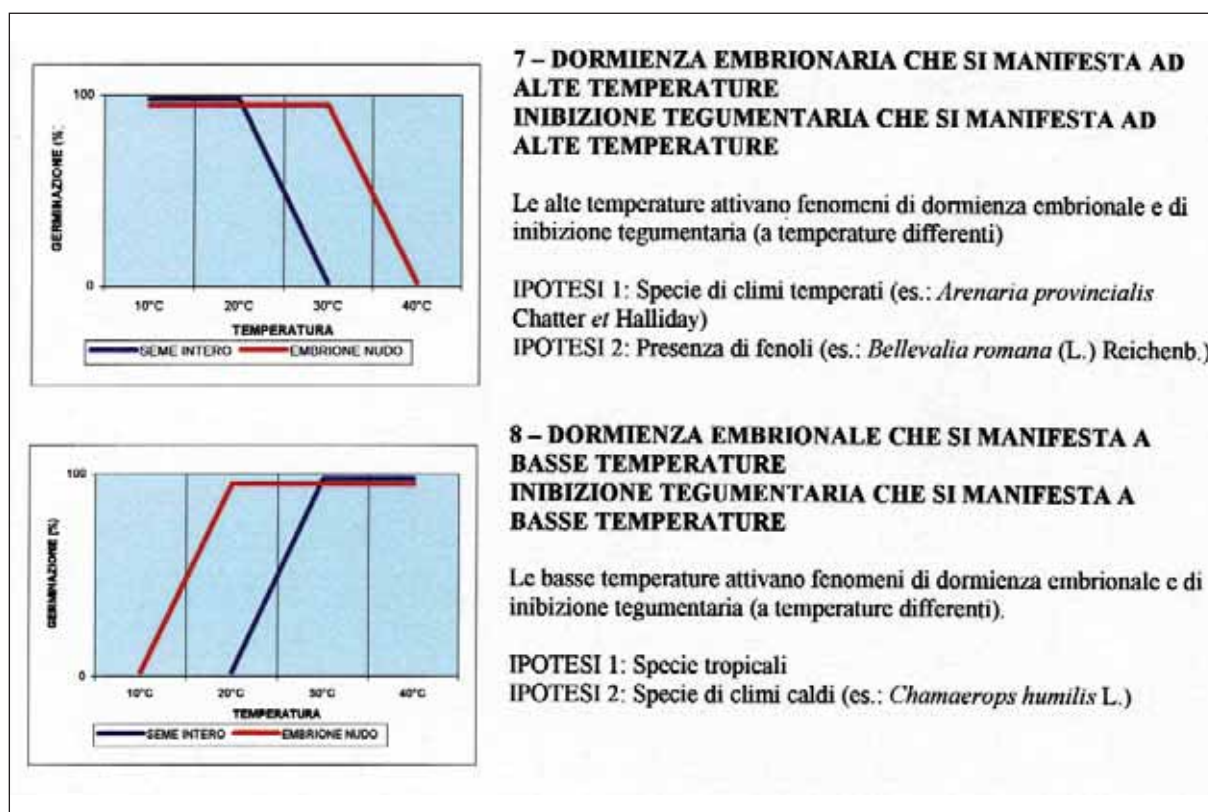
6 - NESSUNA DORMIENZA EMBRIONARIA INIBIZIONE TEGUMENTARIA CHE SI MANIFESTA A TEMPERATURE ELEVATE

A temperature elevate si attiva una inibizione alla germinazione a livello tegumentario.

IPOTESI 1: Specie di climi temperati (es.: *Armeria belgenciensis* Donadille ex Kerguelen)

IPOTESI 2: Presenza di fenoli (es.: *Rouya polygama* (Desf.) Coincy)

IPOTESI 3: Fotosensibilità positiva (es.: *Nigella sativa* L.)



Segue - Figura 34

8.4 Eliminazione delle dormienze (pretrattamenti)

Con il termine pretrattamento si indica l'insieme di processi, cure, manipolazioni o altri condizionamenti che precedono la semina, effettuati con l'obiettivo di rendere massima l'entità, la velocità e l'uniformità della germinazione (Mezzalana *et* Piotta, 2003; Piotta, 2005). In questo ambito i termini "pretrattamento" e "trattamento" sono da considerarsi sinonimi, ma si impiega largamente il primo in quanto suggerisce un processo che si applica "prima" della germinazione. In senso lato, sono da considerare "pretrattamenti" anche molti processi che non agiscono direttamente sulla rimozione delle dormienze (confettatura, disinfezione, etc.)

Per diversi motivi quali dormienza fisiologica, tegumenti particolarmente spessi ed impermeabili, presenza di sostanze inibitrici della germinazione (tab. 3), un considerevole numero di semi, al termine del test di germinazione, potrebbe rimanere vitale ma non germinare. Per ottenere una migliore germinazione delle accessioni sarebbe quindi opportuno pretrattare i semi prima di iniziare il test vero e proprio. La durata di questi trattamenti non deve comunque essere computata nel periodo di germinazione vero e proprio (ISTA, 2006).

I Metodi ufficiali di analisi per le sementi (Ministero Agricoltura e Foreste, *op. cit.*) indicano il/i pretrattamento/i a cui sottoporre i semi di numerose specie erbacee, arbustive, arboree e officinali presenti in Italia. Nello stesso modo autorevoli Istituzioni come l'*International Seed Testing Association* (ISTA), l'*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), il *Natural Resources Conservation Service* dell'*United States Department of Agriculture*, *The Native Plant Network*, *The Reforestation, Nursery and Genetic Resources Team*, *Kew Gardens*, e tante altre istituzioni studiano

e aggiornano permanentemente protocolli per ottimizzare i risultati delle procedure atte a propagare le piante oppure per determinare la qualità dei semi, compresa la germinazione ed i pretrattamenti per rimuovere eventuali dormienze. Tuttavia, per molte specie non ci sono notizie in merito per cui, in questi casi, si può ricorrere alle procedure descritte in 8.3.1 e 10.2.

Si descrivono di seguito i pretrattamenti più comunemente usati per rimuovere la dormienza dei semi prima della semina o dei test di germinazione. Data la forte variabilità del carattere “dormienza”, i pretrattamenti potrebbero agire positivamente solo su una parte del lotto (solo quella porzione le cui richieste sono completamente soddisfatte dal pretrattamento) e comportare così una sorta di selezione con perdita di variabilità genetica. Da alcuni anni si studia per contenere questo rischio (Suszka *et al.*, *op. cit.*; Jones *et al.*, *op. cit.*; Piotto, 1997).

8.4.1 Stratificazione fredda, vernalizzazione o prechilling

Con il termine *prechilling* (sinonimo di vernalizzazione o stratificazione fredda) si intende l'esposizione dei semi dormienti a temperature variabili da +2° a +5°C (Côme, *op. cit.*) in condizioni umide ed arieggiate (nudi o mischiati ad un substrato soffice) per periodi caratteristici per ogni specie o lotto. Il *prechilling* simula l'azione che l'inverno esercita su alcuni semi.

Una soluzione alternativa alla stratificazione fredda, che può durare anche diverse settimane, è talvolta l'applicazione di ormoni quali gibberelline (GA3) (IBPGR, 1985b).

8.4.2 Stratificazione calda, estivazione, preheating o warming

Con il termine *preheating* (sinonimo di stratificazione calda, estivazione o *warming*) si intende l'esposizione dei semi ad una temperatura non superiore a 30-35°C (generalmente 15-20°C) in condizioni umide, ma con una libera circolazione d'aria per un periodo variabile a seconda della specie. La stratificazione calda condotta artificialmente sostituisce quello che avviene durante l'estate e quasi sempre precede quella fredda. Quando si applicano più cicli di stratificazione calda e stratificazione fredda, l'ultimo pretrattamento applicato è quello freddo.

8.4.3 Affumicazione

Per agevolare la germinazione in alcune piante associate al ciclo degli incendi, oltre ad un trattamento termico può essere utile l'affumicazione dei semi (es.: *Ericaceae*). Il trattamento, ideato e sviluppato già dal 1990 presso il *Kirstenbosch National Botanical Garden di Claremont* di Cape Town (Sudafrica), prevede la semina in dischi di carta imbevuti con una soluzione satura di una combinazione di sostanze naturali, che si liberano durante gli incendi del *fynbos* sudafricano (vegetazione di tipo mediterraneo), al quale viene aggiunto un volume determinato di acqua in cui i semi vengono lasciati imbibire per 24 ore. Altri centri di ricerca che si occupano di specie di ecosistemi di tipo mediterraneo in California e Australia hanno sviluppato trattamenti analoghi che, sostanzialmente, tentano di imitare l'effetto degli incendi sulla germinazione.

Numerose specie presenti in vari ecosistemi di tipo mediterraneo rispondono significativamente a pretrattamenti basati sul fumo. Per le specie del bacino del Mediterraneo, invece, il fenomeno è stato oggetto di ricerche solo negli ultimi anni (Crosti *et al.*, *op. cit.*). Le specie che sono stimulate dal fumo, che va considerato come sottoprodotto molto specifico dell'incendio, non necessariamente lo sono anche dallo shock termico che produce il fuoco. Infatti, l'azione del fumo sembra essere di na-

tura chimica mentre il calore agisce attraverso un meccanismo fisico-meccanico. Il fumo potrebbe, quindi, avere un effetto diretto ma anche indiretto tramite soluzioni acquose o gas che raggiungono i semi. Tra le specie positivamente sensibili, la risposta al fumo varia in relazione alla quantità di principio attivo contenuto in questo elemento ed al tempo di esposizione. Recentemente è stata isolata dal fumo una sostanza del gruppo dei butenolidi che agisce, anche a bassissime concentrazioni, in modo analogo a quello del fumo nella stimolazione della germinazione. Inoltre, questa sostanza stimola la germinazione anche al buio di molte specie, come numerose *Asteracee* australiane, che hanno bisogno di luce per germinare, e questo perché provocherebbe effetti analoghi all'acido gibberellico (Merritt *et al*, 2006).

Molto spesso i semi sensibili al fumo hanno tegumenti peculiari dotati di uno strato subdermico che, quando il seme è quiescente, può consentire l'assorbimento dell'acqua ma non di determinati soluti. L'azione del fumo modificherebbe questo tessuto rendendolo più permeabile e favorendo così i processi germinativi. Le diverse specie, nonché le provenienze nell'ambito di una specie, darebbero risposte fortemente variabili determinando in questo modo una marcata influenza nella composizione della comunità vegetale che succederà l'incendio.

L'effetto del fuoco sulla vegetazione è particolarmente complesso (Fenner *et Thompson*, 2005) perché influisce su luce, umidità, temperatura, pH, disponibilità di spazio e di nutrienti; tuttavia il fumo è da considerarsi uno dei fattori determinanti nella rimozione della dormienza in specie spontanee in ecosistemi di tipo mediterraneo.

8.4.4 Scarificazione

I semi di alcune specie appartenenti a famiglie con tegumenti seminali o endocarpi legnosi molto duri e impermeabili (es.: *Fabaceae*, *Cistaceae*, *Convolvulaceae*, *Oleaceae*, etc.) devono essere sottoposti ad abrasione attraverso trattamenti di natura meccanica, chimica e fisica per consentire loro l'assorbimento dell'acqua.

La scarificazione può essere eseguita prima dell'inizio del test o, quando si sospetta che il trattamento possa danneggiare i semi già idratati, alla fine della prova e solo per quei semi che non si sono imbibiti.

La scarificazione meccanica prevede la foratura, il taglio o l'abrasione con carta vetrata dei tegumenti esterni (fig. 35) al fine di permettere l'imbibizione dei semi. La porzione del seme più adatta per la scarificazione meccanica è quella situata immediatamente al di sopra dell'apice dei cotiledoni (ISTA, 2006).

La scarificazione di tipo chimico prevede l'immersione dei semi in acido solforico al 96 % per un tempo variabile, al fine di assottigliare i tegumenti. Dopo il trattamento i semi devono essere risciacquati in acqua corrente prima di avviare il test di germinazione o procedere alla semina.

La scarificazione fisica dei semi consiste essenzialmente in un trattamento in acqua bollente e in un successivo ammollo di 12-24 ore al fine di ammorbidire i tegumenti e favorire l'imbibizione. L'acqua deve essere allontanata dalla fonte di calore prima di versare i semi e la massa, generalmente costituita da dieci parti d'acqua per ogni parte di seme, deve essere mescolata di tanto in tanto fino al suo raffreddamento (Mezzalana *et Piotto*, *op. cit.*).

Perché il carattere "durezza" del tegumento è estremamente variabile, la scarificazione fisica e quella chimica possono esercitare una pressione selettiva attraverso la distruzione dei semi con i più blandi nonché con la mancata abrasione dei semi con tegumenti molto duri.

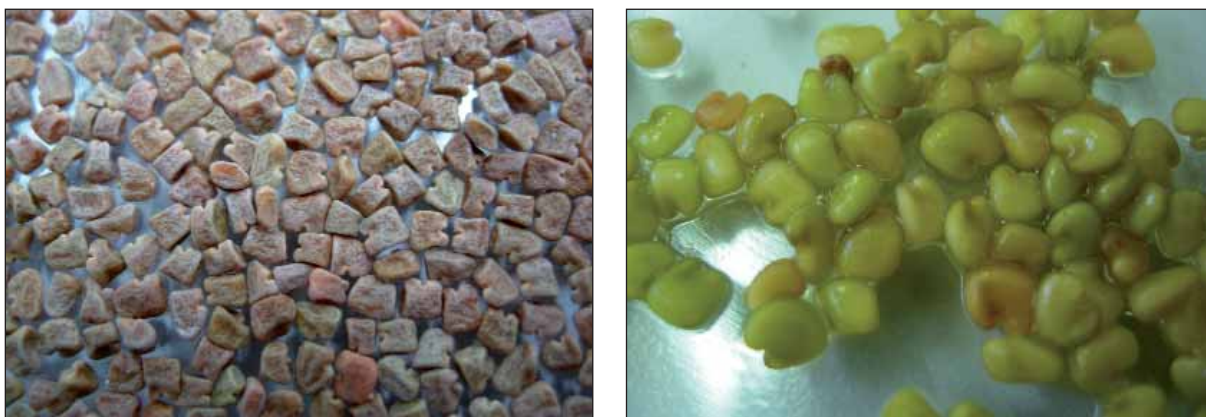


Figura 35 - Semi di *Astragalus maritimus* Moris prima (a sinistra) e dopo (a destra) 24 ore di imbibizione. I semi sono stati abrasi manualmente con l'impiego di carta vetrata. (foto: E. Mattana)

8.4.5 Rimozione dei tegumenti

Per alcune specie che presentano dei tegumenti particolarmente duri, la sola scarificazione non determina un indebolimento tale da permettere la fuoriuscita della radichetta. In questi casi è bene utilizzare una pinza per rimuovere questi tegumenti avendo cura di non danneggiare l'embrione.

8.4.6 Rimozione delle sostanze inibitrici della germinazione

La presenza di sostanze chimiche all'interno dei semi o nei tegumenti può ritardare o inibire la germinazione. La presenza di tali sostanze può essere rivelata dalla formazione di aloni colorati attorno ai semi sul substrato di germinazione che si sta utilizzando. Le sostanze inibitrici della germinazione possono essere rimosse con un prelavaggio in acqua o in alcool (90°) ad una temperatura di 25°C e facendo riasciugare i semi prima di effettuare il test. Per alcune *Poaceae* ciò può essere effettuato mediante la rimozione di strutture esterne dei semi come lemma e palea (ISTA, 2006).

Le sostanze fenoliche sono spesso responsabili dell'inibizione della germinazione perchè agiscono diminuendo l'apporto di ossigeno a livello embrionale, soprattutto quando le temperature sono superiori a 10°C. La loro eliminazione si può effettuare mediante lavaggi successivi in acqua o alcool, ma in particolar modo impiegando temperature di germinazione sufficientemente basse al fine di aumentare la dissoluzione dell'ossigeno nell'acqua di imbibizione (Côme *et* Corbineau, *op. cit.*).

L'ammollo dei semi in un potente ossidante (es.: acqua ossigenata, candeggina) permette l'ossidazione di molte sostanze inibitrici rendendole inefficaci (Ogawa *et* Iwabuchi, 2001) oltre all'eliminazione di alcuni patogeni.

8.5 Consigli pratici⁴

I laboratori delle banche del germoplasma non sempre sono dotati di strumentazioni e materiale tecnico che consentano la rapida ed efficace identificazione delle esigenze per la germinazione di una determinata specie.

⁴ Queste osservazioni nascono dall'esperienza acquisita in più di 25 anni presso la Banque de Semences del Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles e si presentano in forma di suggerimenti pratici nei casi in cui si opera con limitazioni di strumentazioni e/o strutture necessarie allo studio della germinazione.

E' quindi estremamente importante annotare le condizioni verificatesi e qualsiasi tipo di osservazione al fine di definire al meglio, ed eventualmente migliorare, i protocolli con i mezzi disponibili. Alcune combinazioni di temperature/luce, temperature/acqua, etc., possono permettere di semplificare il lavoro, ma potrebbero essere difficilmente riproducibili da un altro laboratorio che non disponga delle stesse strumentazioni. E' bene ricordare che acqua, temperatura e luce giocano un ruolo specifico per ogni specie e che le combinazioni di questi fattori, se non monitorate con attenzione, possono complicare l'interpretazione dei risultati di un test di germinazione.

8.5.1 Acqua

La sua qualità deve essere la migliore possibile, pertanto si raccomanda l'impiego di acqua distillata o prodotta per osmosi. Se il laboratorio non dispone delle attrezzature adatte a tale scopo, si può utilizzare dell'acqua minerale (di debole mineralità) disponibile in commercio; tale tipologia è da preferire ad acqua di sorgente o di rubinetto le cui caratteristiche possono variare nel tempo. Bisogna perciò annotare sulla scheda di germinazione la marca commerciale dell'acqua utilizzata. La bottiglia d'acqua, una volta aperta, deve essere conservata a +5°C e utilizzata nel più breve tempo possibile. I laboratori devono valutare la convenienza di acquistare acqua oppure di impiegare un distillatore o un apparecchio a osmosi.

L'uso di purificatori domestici deve essere evitato in quanto, pur eliminando il calcare, i nitrati ed i metalli pesanti presenti nell'acqua di rete, rilasciano dell'acqua contenente sali di sodio che può risultare negativa per la germinazione di alcune specie.

La quantità d'acqua utilizzata per l'imbibizione della carta da filtro durante i test di germinazione deve essere controllata durante le prime 48 ore e eventualmente aggiunta se si osserva una disseccazione del substrato.

8.5.2 Ossigeno

Parametro difficile da governare, se non utilizzando basse temperature che provocano una grande solubilità di questo gas nell'acqua di imbibizione o, al contrario, alte temperature per ridurre la sua presenza.

8.5.3 Temperatura

Nelle condizioni ideali il laboratorio di una banca del germoplasma dovrebbe disporre di una batteria di incubatori a temperature costanti e alternate combinate all'illuminazione, nonché di una tavola a gradiente termico. Tuttavia tutte queste strumentazioni non sempre sono disponibili.

Dal punto di vista tecnico e finanziario un incubatore a temperatura costante è più semplice da reperire e consente di realizzare prove facilmente riproducibili da terzi. Infatti l'efficacia dei cicli termici dipende dalle temperature applicate, dalla durata dell'esposizione ad ogni temperatura, dallo scarto tra queste e dal tempo che gli incubatori impiegano per aumentare o diminuire le temperature (in funzione del ciclo impostato). Tutto ciò influisce sull'entità e la velocità di germinazione. E' evidente che tante variabili, incidendo su di un unico parametro, complicano l'analisi dei risultati delle prove di germinazione.

8.5.4 Luce

La durata dell'illuminazione, i cicli applicati, l'intensità, la qualità, la lunghezza d'onda emessa, la tipologia della camera di crescita, la durata a livello qualitativo (nella maggior parte dei casi è di un anno) e la reperibilità delle lampade impiegate, sono elementi importanti da valutare e da annotare.

Se si combina il parametro luce con una alternanza di temperature, diventa talvolta difficile riuscire a riprodurre un protocollo di germinazione al di fuori del proprio laboratorio. Alcune volte la durata dell'illuminazione necessaria per indurre la germinazione di alcune specie non supera alcuni minuti. A seconda dei casi, le esigenze di germinazione alla luce o al buio possono essere annullate grazie alla deidratazione, decorticazione o scarificazione dei tegumenti, l'utilizzo di temperature più fredde per semi inibiti dall'oscurità o più calde per semi inibiti dalla luce. L'influenza particolare della luce su alcuni semi spiega perché questi, da lungo tempo quiescenti nel suolo, germinano a seguito di una aratura perché portati in superficie.

Semi fotosensibili possono talvolta avere una migliore germinazione dopo 6-12 mesi di conservazione al secco e al freddo.

8.5.5 Ormoni ed altri prodotti

Gibberelline

La loro applicazione non è sempre necessaria in presenza di una presunta dormienza. Inoltre, se si desidera conservare le plantule per una moltiplicazione, questa si rivelerà più difficile per l'eziolamento generato dall'impiego di ormoni. Se l'applicazione di gibberelline è comunque necessaria per la produzione di plantule, bisognerà ricorrere ad un metodo di coltura adeguato, spesso realizzabile soltanto in condizioni ambientali controllate: illuminazione adeguata per un minimo di 14-24 ore e alternanza di temperature con uno scarto molto pronunciato tra il periodo notturno e diurno. Tuttavia, applicando questo metodo di coltura non tutte le piante potranno essere mantenute.

L'impiego di gibberelline permette in molti casi di eliminare la dormienza dovuta alla fotosensibilità positiva dei semi.

La soluzione di gibberelline confezionata in laboratorio va conservata al freddo e al buio per un periodo massimo di una settimana, altrimenti si rischia di non ottenere l'effetto desiderato.

Impiego di altri prodotti

Alcuni fungicidi impiegati per evitare infezioni durante la germinazione possono indurre difetti o ritardi nella crescita, così come altre sostanze pesticide non ancora testate possono portare a dei difetti nello sviluppo, dei ritardi nella fioritura, etc. E' pertanto in genere sconsigliabile l'impiego di fitofarmaci.

8.6 Determinazione ed elaborazione del o dei protocolli

Per pianificare correttamente i test di germinazione è opportuno effettuare un'indagine bibliografica preliminare, volta ad acquisire il maggior numero possibile di dati ed informazioni sull'anatomia, la fisiologia e la biologia dei semi nonché sull'autoecologia del *taxon* in esame. Allo stesso tempo è utile consultare, sia in pubblicazioni specifiche sia attraverso siti web di istituzioni riconosciute, algoritmi e protocolli di germinazione già sperimentati, anche di *taxa* filogeneticamente e/o ecologicamente affini. In questo modo sarà possibile al curatore della banca, sulla base delle strumentazio-

ni e delle metodologie in possesso, programmare un protocollo specifico, individuando i diversi parametri ed il numero delle repliche relative in base alla disponibilità di semi.

Esistono diverse metodiche per la standardizzazione dell'elaborazione di protocolli di germinazione (Terry *et al.*, 2003); tuttavia va considerato che tali procedure sono condizionate dalle strutture e strumentazioni in dotazione alle banche (ad esempio numero di incubatori, dotati o meno di regolazione di termo e fotoperiodo, etc.) e pertanto ogni banca adotta il protocollo più consono in funzione delle attrezzature di cui dispone e delle proprie esigenze.

La Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR) utilizza il seguente schema decisionale, di tipo dicotomico, in linea con quanto previsto da standard internazionali quali IPGRI (1985b) e ISTA (2006):

1. Ricerca bibliografica preliminare	2
2. Consultazione di algoritmi e protocolli di germinazione già sperimentati, anche di <i>taxa</i> simili secondo criteri filogenetici e/o ecologici:	
a. Non esiste un protocollo già definito	3
b. Esiste un protocollo già definito	7
3. Pretrattamenti	
a. Estivazione (es.: <i>Primulaceae</i>)	4
b. Vernalizzazione (es.: <i>Cistaceae</i>)	4
c. Affumicazione (es.: <i>Ericaceae</i>)	4
d. Scarificazione (es.: <i>Fabaceae</i>)	4
e. Eliminazione di sostanze inibitrici della germinazione (es.: <i>Poaceae</i>)	4
4. Imbibizione	
a. Semi non imbibiti	3
b. Semi imbibiti	5
5. Semina	
a. Trattamento chimico (KNO ₃ , GA3, etc.)	
i. Oscurità e temperatura costante	
% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
ii. Fotoperiodo e temperatura costante	
% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
iii. Fotoperiodo e temperatura alternata	
% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
b. Acqua distillata (nessun trattamento)	
i. Oscurità e temperatura costante	
% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
ii. Fotoperiodo e temperatura costante	

% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
iii. Fotoperiodo e temperatura alternata	
% di germinazione < 50%	6
% di germinazione > 50%	7
6. Esecuzione del test di vitalità	
a. I risultati del test di germinazione non vengono confermati (vitalità alta)	5
b. I risultati del test di germinazione vengono confermati (vitalità bassa)	7
7. Esecuzione del test di germinazione di conferma	
a. I risultati non vengono confermati	5
b. I risultati vengono confermati	VALIDAZIONE DEL PROTOCOLLO

Il numero di semi che debbono essere analizzati può variare in funzione della disponibilità effettiva dei medesimi (se la quantità è esigua spesso si rinuncia ad effettuare prove distruttive) nonché dei differenti protocolli di germinazione. In relazione al numero di semi a disposizione e sulla base dell'esperienza maturata presso la Banca del Germoplasma della Sardegna, viene proposto il seguente schema:

- n. semi <500 unità = non si effettuano test di germinazione;
- n. semi 500-1000 unità = il n. dei semi da analizzare è pari ad un massimo del 10%;
- n. semi 1000-5000 unità = il n. dei semi da analizzare è pari al 10-20%;
- n. semi >5000 unità = il n. dei semi da analizzare è pari ad un massimo del 20%.

Bisogna tuttavia considerare che lavorando con popolazioni di unità tassonomiche rare e/o a rischio di estinzione, difficilmente si avranno a disposizione lotti costituiti da almeno 500 semi. In questi casi la scelta del numero di repliche e di semi per replica deve essere attentamente ponderata prendendo in considerazione diversi parametri tra cui:

- grado di criticità/minaccia del *taxon*;
- disponibilità di materiale proveniente da altre popolazioni dello stesso *taxon*;
- disponibilità di accessioni della popolazione in esame relative ad anni precedenti.

Le condizioni standard di germinazione alle quali sottoporre semi di *taxa* non ancora conosciuti contemplano le combinazioni dei seguenti fattori:

- temperatura 5°C⁵, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, (in funzione anche dell'area geografica indagata);
- fotoperiodo 12/12 h;
- agar 0,5%-1% o carta bibula (3 fogli)⁶;
- acido gibberellico 120 - 800 ppm (IBPGR, 1985b);
- durata del test variabile da 30 a 60 gg., salvo eccezioni;
- n. 1 o più capsule Petri la cui dimensione dipende dal tipo di semi;
- KNO₃ (0,2% p/v.) (Côme, *op. cit.*; IBPGR, 1985b; ISTA, *op. cit.*).

⁵ La replica a 5°C, qualora non si ottengano risultati positivi, dopo 1-2 mesi, nelle prime prove, può essere trasferita a temperature superiori, in modo da valutare l'eventuale necessità di un periodo di *prechilling*. Ci sono, comunque, specie per cui la temperatura ottimale di germinazione è prossima ai 5°C (es.: *Fagus sylvatica*).

⁶ I due tipi di substrato presentano caratteristiche differenti e vengono utilizzati in alternativa a seconda della conduzione del test e della tipologia dei semi: la possibilità di lavorare in ambiente sterile o di lavorare con semi o spore di dimensioni molto ridotte (es.: spore di pteridofite o semi di *Orchidaceae*), al contrario semi di grandi dimensioni rischiano di assorbire tutta l'acqua presente nella soluzione di agar determinando quindi un fattore limitante alla germinazione.

Per permettere una corretta analisi (compresa quella statistica) dei risultati, si raccomanda di realizzare le osservazioni (fig. 36) tutti i giorni subito dopo l'avvio del test e, in seguito, ogni due giorni per tutta la durata dello stesso.

Nei casi in cui l'esito negativo della prova di germinazione sia imputabile all'insorgenza di inquinamenti fungini, si riterrà necessario ripetere la prova, previo trattamento antimicotico.

Il trattamento antimicotico può essere effettuato prima dell'inizio del test immergendo il materiale in una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) commerciale al 1-2% per 5-10 minuti. In alternativa, al momento della semina delle repliche in capsule Petri, imbevendo la carta da filtro con una soluzione di hymexazol al 36% p/v, fungicida che può essere utilizzato sui semi e sul substrato (De Liñán, 2004), ad una concentrazione di 0,1 ml di prodotto per 500 ml di acqua distillata (Picher *et* Campos, *in verbis*).

Nel caso intervengano delle infezioni durante il test si sostituiscono la capsula Petri, la carta da filtro, si lavano con acqua e successivamente si trattano i semi con ipoclorito di sodio.

Per i semi particolarmente rugosi e difficili da sterilizzare (es.: *Astragalus* sp. pl.), è preferibile impiegare soluzioni specifiche come "Tween 20™" e preparare una soluzione allo 0.1 %; questo composto riduce la tensione superficiale e favorisce un contatto migliore del liquido con il tegumento del seme. Dopo il trattamento, il germoplasma deve essere meticolosamente risciacquato sotto acqua corrente.



Figura 36 – Controllo di un test di germinazione di *Astragalus maritimus* Moris. (foto: E. Mattana)

8.7 Analisi dei risultati

Le osservazioni effettuate durante il test di germinazione permettono la caratterizzazione dei risultati ottenuti. A tal fine si presentano di seguito gli strumenti utili per l'analisi dei risultati.

8.7.1 Categorie di valutazione

Durante il monitoraggio del test di germinazione è possibile osservare e annotare il numero dei semi germinati e quello dei semi morti; alla fine del test si possono generalmente identificare (v. 13.11) le seguenti categorie di semi (ISTA, *op. cit.*; Ministero Agricoltura e Foreste, *op. cit.*):

- germinati;
- imbibiti: semi che a fine test pur risultando freschi, vitali e imbibiti non sono germinati;
- non imbibiti: semi che a fine test non risultano essersi imbibiti (generalmente hanno tegumenti molto duri che necessitano di scarificazione);
- morti: semi risultati morti nei diversi controlli;
- altre categorie: semi che non rientrano nelle categorie sopraelencate; in particolare rientrano in questa categoria i semi infestati ed i semi vuoti (ISTA, *op. cit.*).

La somma delle percentuali dei semi appartenenti a tutte le categorie deve essere uguale a 100 ed il loro numero totale deve corrispondere al numero di semi posti a germinare all'inizio del test. All'interno dei semi germinati è possibile effettuare una ulteriore distinzione (ISTA, *op. cit.*):

- Semi germinati con plantule normali: sono considerate plantule (germinelli) normali quelle provviste di organi essenziali alla vita della futura pianta. Queste si distinguono in tre categorie: plantule intatte, con lievi difetti e con infezioni secondarie.
- Semi con plantule anormali: semi che pur avendo germinato non presentano plantule tali da poter essere considerate normali. Anche in questo caso vengono distinte tre categorie: plantule danneggiate, deformate e deteriorate⁷.

8.7.2 Percentuale di germinazione

La percentuale di germinazione viene calcolata per ogni replica ed è data dal rapporto fra il numero di semi germinati e il numero totale di semi, moltiplicato per cento:

$$(\text{Numero di semi germinati/numero totale di semi}) \times 100$$

La percentuale finale del test sarà calcolata facendo la media tra tutte le repliche sottoposte alle stesse condizioni di germinazione.

8.7.3 Velocità di germinazione ('T50')

Il T50 è il parametro maggiormente utilizzato per determinare la velocità di germinazione. Si calcola in numero intero di giorni e corrisponde al tempo necessario per ottenere il 50% della capacità germinativa del lotto (Côme, *op. cit.*).

Tale valore si può calcolare per interpolazione lineare secondo la formula in Coolbear *et al.* (1980), leggermente modificata secondo la definizione fornita da Thanos *et Doussi* (1995):

con:

$$T_{50} = \frac{[(N/2) - N_1] \times (T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1$$

- N = percentuale finale di semi germinati;
 N₁ = percentuale di semi germinati leggermente inferiore di N/2;
 N₂ = percentuale di semi germinati leggermente superiore a N/2;
 T₁ = numero di giorni che corrispondono a N₁;
 T₂ = numero di giorni che corrispondono a N₂.

Il calcolo del T50 risulta molto utile nei casi in cui il periodo di germinazione si riveli molto lungo (diversi mesi) e permette altresì di verificare sempre la qualità del protocollo. Consente inoltre di valutare indirettamente il vigore di un lotto di semi in quanto la velocità di germinazione ne è una espressione.

⁷ Per la valutazione delle plantule risulta di particolare ausilio il manuale ISTA "Seedling Evaluation" (Don, 2003).

8.7.4 Ritardo di germinazione

E' il tempo necessario (in giorni) per osservare il primo seme germinato. Non dipende solamente dalle caratteristiche della specie, ma è un indicatore dello stato di invecchiamento di lotti conservati (quando si comparano i risultati ottenuti con lo stesso protocollo di germinazione applicato a semi testati subito dopo la raccolta oppure a distanza di diversi anni di conservazione).

8.7.5 Curve di interpretazione

Con i risultati ottenuti durante il test di germinazione è possibile tracciare diverse tipologie di curve di analisi dei risultati. Di seguito si presentano due tipologie di grafici (fig. 37 e 38) che vengono utilizzati per analizzare, caratterizzare e visualizzare i dati. Per questi grafici è possibile utilizzare il T50 in luogo della percentuale di germinazione.

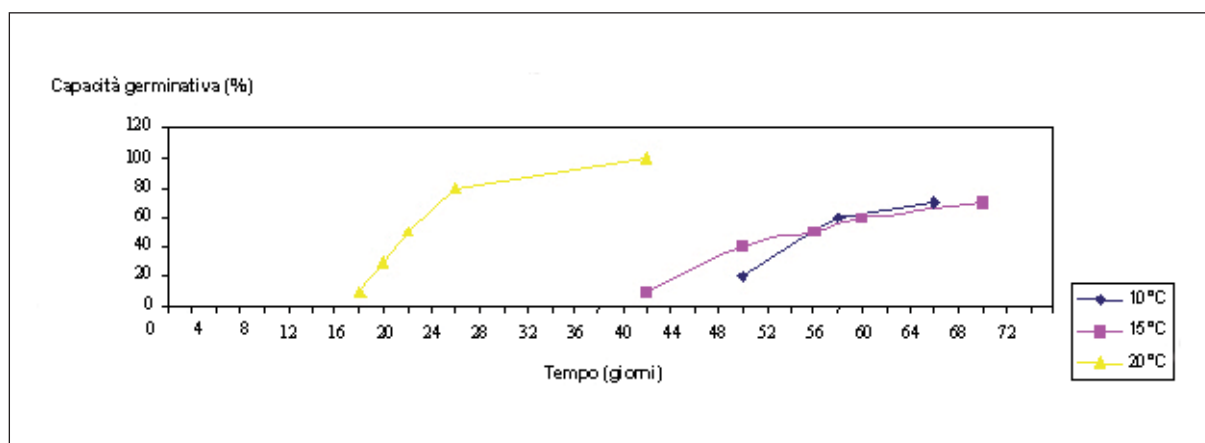


Figura 37 - Curva di germinazione dei semi freschi di *Pancratium maritimum* (dati: M. Virevaire)

Percentuale di germinazione in rapporto al tempo

In fig. 37 vengono rappresentate in ordinata le percentuali di germinazione e in ascissa il tempo.

Si può dedurre che il ritardo di germinazione in relazione alle temperature impiegate per il test è di 18 gg per 20°C, 42 gg per 15°C e 48 gg per 10°C. Il tempo totale della prova è di 42 gg per 20°C e ben oltre per le altre temperature. In termini di velocità ed entità di germinazione, la temperatura più efficace per questo lotto, alle condizioni di test (semi interi, oscurità, capsule Petri umidificate con acqua distillata) è dunque di 20°C. Tale test è stato condotto su *Pancratium maritimum*, specie che non presenta dormienze, e utilizzato per generalizzare i risultati percentuali della germinazione in funzione di diversi protocolli normalmente applicati utilizzando semi freschi per valutare la qualità del lotto in ingresso.

Tramite questo tipo di grafici si possono comparare diverse serie di dati al fine di valutare in modo immediato differenti protocolli, metodi di conservazione, raccolte relative a diverse popolazioni o a una stessa popolazione ma con prelievi eseguiti in anni differenti.

Percentuale di germinazione in rapporto ai differenti protocolli

Di seguito, in fig. 38 vengono rappresentate in ordinata le percentuali di germinazione e in ascissa le differenti temperature testate. Grazie a questa tipologia di grafico è possibile valutare i differenti metodi di conservazione e determinare la temperatura ottimale di germinazione.

I test utilizzati per tale generalizzazione sono stati realizzati su un campione relativo ad un'unica raccolta, sia subito prima della conservazione, sia dopo diversi anni di stoccaggio con diverse modalità. I semi appena raccolti sono stati sottoposti a prove per valutare le caratteristiche germinative del lotto, che sono servite da riferimento per i test successivi. Per ogni metodo di conservazione i semi sono stati puliti e stoccati con gel di silice alla temperatura indicata nel grafico, salvo per quelli conservati a temperatura ambiente di laboratorio (15-38°C). Il raffronto tra la curva dei semi freschi con quelle relative ai diversi metodi di conservazione (5°C, congelazione e liofilizzazione) mostra come al momento della raccolta, e quindi del test di germinazione, la totalità dei semi non era ancora giunta a maturità fisiologica. In effetti, i semi conservati hanno subito una postmaturazione raggiungendo una maggiore omogeneità del lotto successivamente, dopo la loro deidratazione (sono stati conservati a freddo, a temperatura ambiente e a 20°C).

Nel grafico si evidenzia una temperatura ottimale di germinazione di 20°C per i semi appena raccolti; emerge altresì che la temperatura ottimale sia in realtà di 15°C, salvo per i semi liofilizzati che germinano bene in una ampia gamma di temperature.

Le temperature ottimali per la germinazione sono quindi comprese tra 15 e 20°C, mentre si osserva un forte calo percentuale di germinazione a temperature inferiori. Considerando che i semi presentano una gamma di temperature ottimali più ristretta, che va riducendosi all'aumentare del tempo di conservazione, e che i semi diminuiscono la loro vitalità con l'aumentare della durata dello stoccaggio, è possibile individuare delle ipotesi sul metodo di conservazione migliore. A tal proposito, si evidenzia che è certamente utile continuare ad approfondire le ricerche comparando gli stessi lotti della stessa raccolta al fine di valutare il miglior metodo di conservazione per la specie studiata.

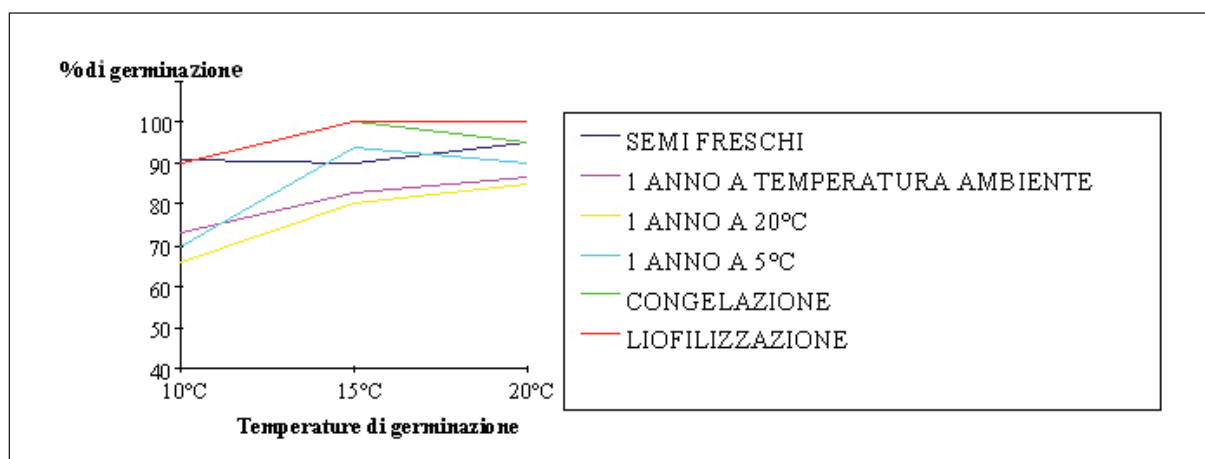


Figura 38 - Percentuali di germinazione di *Pancratium maritimum* in funzione della modalità di conservazione e della temperatura di germinazione. (dati: M. Virevaire)

9. GESTIONE DEL GERMOPLASMA

9.1 Gestione dei dati e dei campioni

La gestione quotidiana di una banca del germoplasma prevede il controllo e il monitoraggio di diverse strutture, attrezzature e parametri.

Periodicamente vengono eseguiti controlli dei lotti conservati per verificare che i contenitori mantengano una perfetta ermeticità; a tal fine è importante osservare, con una elevata frequenza, se l'indicatore di umidità presenta un eventuale viraggio, determinato dall'umidità in eccesso.

Ogni 5-10 anni, a seconda del tipo di germoplasma e delle quantità disponibili, vengono effettuate delle prove di germinazione sul materiale conservato (dopo averlo riequilibrato a temperatura e umidità ambiente per alcuni giorni) per testare il quantitativo percentuale di semi vitali. Quando il livello di vitalità scende al di sotto di certi valori (che dipendono dalla qualità iniziale del lotto e dalla specie trattata), si rende necessario procedere con una nuova raccolta o con la rigenerazione in vivaio/laboratorio approfondendo le indagini sull'entità. Come riferimento possono essere presi in considerazione gli standard di rigenerazione proposti dall'IPGRI, variabili dal 65 all'85% e riferibili ad accessioni di 10-20 anni conservate in collezioni attive (FAO/IPGRI, *op. cit.*).

Per la gestione di una piccola banca del germoplasma sono sufficienti l'ausilio di un registro o di schede cartacee. Nel momento in cui le accessioni, col passare degli anni, diventano più numerose, si rendono necessari dei sistemi di gestione informatizzati. Un primo approccio può essere fatto attraverso un foglio di calcolo, ma uno specifico software di gestione dati è uno strumento prezioso per amministrare le accessioni. Per questo motivo molte banche nel tempo hanno deciso di sviluppare degli strumenti dedicati e, più nello specifico, delle banche dati. Così ha fatto, ad esempio, il *Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles* (CBNMP) che ha sviluppato un software gestionale per la propria banca del germoplasma, denominato VANDA (fig. 39). Questo strumento si divide in due parti: una che gestisce l'immagazzinamento dei dati e l'altra che permette delle ricerche secondo criteri di *multi query*. Il software utilizza dei menù che danno accesso a dei sottomenù; questi ultimi permettono di aprire una serie di finestre a cascata. Il supporto dei file contenenti dati è archiviato sottoforma di tabelle base che si incrementano ogni volta che viene introdotto un nuovo dato. Le tabelle base sono costituite da: località di raccolta, nomenclatura (che include le caratteristiche biologiche dei *taxa* e le informazioni sulla loro protezione legale), bibliografia e protocolli di germinazione. Le accessioni generano delle schede uniche che permettono una ricerca di carattere gerarchico per test di germinazione e per tipologia di trattamento.

A partire da tale esperienza e da quanto emerso nell'ambito del progetto Genmedoc (fig. 40), sono state elaborate le schede di campo e laboratorio poste in allegato, utilizzate per l'immissione dei dati in un software gestionale dedicato. Tale software permette l'archiviazione, la ricerca e l'aggiornamento del sistema direttamente in rete. Il tutto è garantito da un salvataggio dei dati in tempo reale, grazie ad un server virtuale che consente a un numero illimitato di operatori di lavorare contemporaneamente e di dialogare tra loro. Attualmente il software viene testato presso la Banca del Germoplasma della Sardegna e quella del Dipartimento di Botanica di Catania.

Entrée	Taxon	Station	Commune	Lieu-dit	Date entrée	Date récolte
07257	00720	08299	HYERES	Ile de Port-Crus, Plage de la Palud, arrière	20/05/1994	17/05/1994
07258	00598	08300	NICE	Mont Boron	20/01/1994	01/11/1993
07259	00598	08300	NICE	Mont Boron	20/01/1994	01/11/1993
07260	01159	08302	SAINT-RAPHAEL	Agay, Pourousset, talus SNCF	20/05/1994	12/05/1994
07261	03087	08303	SAINT-RAPHAEL	Pointe de L'Observatoire	20/05/1994	12/05/1994
07262	04358	07241	MONTPELLIER		20/05/1994	02/05/1994
07263	04554	08305	BIZE-MINERVOIS		20/05/1994	23/04/1994
07264	01942	07710	ANTIBES	Pelousse de la Brague	20/06/1994	14/06/1994
07265	05322	08307	FREJUS	Remparts, ruines aqueduc	20/06/1994	14/06/1994
07266	00721	08308	NICE	Mont Boron	30/05/1994	26/05/1994
07267	04979	08309	SAINTE-ANASTASIE		10/06/1994	27/05/1994

Figura 39 - Una schermata di VANDA, software di gestione della Banque de semences du Conservatoire Botanique Méditerranéen de Porquerolles realizzato da M. Virevaire.

Figura 40 – Schermata del database del progetto Interreg IIIB Genmedoc.

9.2 Gestione del materiale vegetativo

Le procedure relative alla raccolta e consegna alla banca del materiale per la propagazione vegetativa (rizomi, tuberi, bulbi, bulbilli, talee, etc.) non si discostano eccessivamente dalle procedure standard precedentemente esposte. Infatti, ogni accessione deve essere corredata dalla corrispondente scheda di raccolta (v. 13.1) ed eventualmente dalle altre schede di campo compilate (es.: scheda di rilievo fenologico 13.2, demografico 13.3, floristico-sociologico 13.4, etc.) e da una lista riepilogativa contenente l'elenco di tutte le schede prodotte e le informazioni relative al raccoglitore.

Al contrario, la conservazione e moltiplicazione del materiale vegetativo presenta sostanziali differenze rispetto alle accessioni costituite da semi, per questo si rende necessaria l'adozione di protocolli specifici secondo il tipo di materiale consegnato alla banca.

Dopo aver inserito i dati relativi alla scheda di raccolta nel database si procede, riportando i dati sulla scheda di gestione del materiale vegetativo (v. 13.13), alla verifica del tipo e della quantità di materiale prodotto e delle eventuali precauzioni da adottare nel maneggiarlo visto che in generale si tratta di materiale più sensibile alla manipolazione e avente tendenza ad una rapida disidratazione se non si conserva in condizioni ambientali adeguate. Quando necessario si individua il trattamento iniziale più idoneo (es.: impiego di fungicidi, eliminazione dei lembi foliari in talee con foglie o tempo e condizioni di conservazione per la formazione dei calli in alcune talee), e si riportano sulla scheda tutte le procedure atte alla conservazione che vengono eseguite sul materiale. Vengono altresì indicati il numero di campioni prodotti, ad esempio quante talee sono state realizzate e, di questi, quanti sono risultati vitali. Infine si assegna ad ogni campione prodotto un codice e per ciascuno si indica la localizzazione e le tecniche utilizzate per l'impianto (v. 13.13).

10. APPROFONDIMENTI

10.1 Indicazioni per la raccolta, conservazione e semina dei semi di alberi e arbusti spontanei in Italia

10.1.1 Introduzione

Attraverso la moltiplicazione per seme delle piante, se si intende gestire correttamente le risorse naturali, si deve puntare a due obiettivi fondamentali:

- contribuire a mantenere o aumentare la biodiversità a livello di specie, traguardo possibile se si ha conoscenza dei meccanismi di propagazione sessuale di un elevato numero di entità vegetali;
- contribuire a mantenere o aumentare la biodiversità a livello genetico impiegando tecniche che impediscano la perdita di variabilità genetica durante l'allevamento delle singole specie.

In relazione a questa ultima considerazione è importante ricordare che i semenzali ottenuti non dovrebbero subire perdite di diversità genetica durante l'allevamento, ovvero si dovrebbero evitare le selezioni volontarie o inconsapevoli che restringano la variabilità dei caratteri genetici. La presenza di forte eterogeneità risulta particolarmente importante nel caso di piante impiegate per i recuperi e ripristini ambientali, mentre lo è di meno in piantagioni a scopo produttivo con cicli brevi.

Non è sempre facile gestire e conservare in vivaio il potenziale biologico rappresentato dalla variabilità dei caratteri genetici ma, in molti casi, si possono minimizzare i rischi di indesiderata erosione tramite l'applicazione di tecniche di allevamento adeguate. Tra queste meritano particolare attenzione le operazioni riguardanti la semina: la conoscenza delle peculiarità biologiche del seme (dormienza, conservabilità, etc.), dell'epoca di semina ideale, dei pretrattamenti necessari a rimuovere eventuali dormienze, nonché delle condizioni che possono favorire o inibire la germinazione. Tutte le sopracitate operazioni, se condotte correttamente, sono essenziali per contenere la perdita di diversità genetica durante le prime fasi dell'allevamento dei semenzali.

Nella tabella che si presenta di seguito (tab. 4) sono riassunte le indicazioni per la raccolta, conservazione e semina dei semi di numerosi alberi e arbusti spontanei in Italia. Le caselle vuote manifestano la mancanza di informazioni o dati specifici per le specie trattate.

Per quanto riguarda la raccolta (v. 4) si indica la stagione in cui è di norma eseguita nonché l'epoca (precedente la raccolta) suggerita per le stime di entità e qualità della fruttificazione.

In relazione alla conservazione (v. 6 e 7) si fornisce il tipo di lavorazione necessaria per ottenere seme destinato alla conservazione o alla propagazione, la temperatura di conservazione e l'attitudine del seme alla conservazione (ovvero la *conservabilità* in condizioni controllate).

La tabella contiene, altresì, l'epoca di semina, sia del germoplasma non sottoposto a trattamento sia di quello trattato e le operazioni da applicare ai semi che mostrano dormienza (v. 8.3 e 10.2). Sono segnalate le specie con dormienze complesse (di difficile rimozione); le specie i cui semi tendono a germinare a temperature molto basse alla fine del trattamento di vernalizzazione e le specie i cui semi tendono a riacquistare lo stato di dormienza (dormienza secondaria) se esposte a temperature relativamente alte in seguito ai trattamenti di presemina (o pretrattamenti) applicati per rimuovere la dormienza primaria.

10.1.2 Note per la consultazione della tabella 4

- (1) Elementi da considerare per procedere alla raccolta: si elencano condizioni che possono indicare il momento ideale dell'operazione, oppure situazioni in grado di interferire negativamente e che debbono quindi essere evitate.
- (2) Tipo di lavorazione del seme: è l'insieme di processi che, a partire dai frutti, consente di ottenere seme libero da impurità ed idoneo alla semina. Le varie tecniche di lavorazione sono state precedentemente descritte (v. 6.4 e 6.6).
- (3) Temperatura di conservazione: si indicano le temperature normalmente impiegate nel Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale, Peri (VR), Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Corpo Forestale dello Stato.
- (4) Conservabilità del seme: è l'attitudine del seme alla conservazione in condizioni controllate. Tale comportamento ha determinato la classificazione del seme in due categorie fondamentali: semi ortodossi e semi recalcitranti. Tra le due categorie estreme vi è un *continuum* di condizioni perciò oggi si tende a classificare i semi in tolleranti o non tolleranti alla deidratazione (Piotto *et* Di Noi, 2003). Per una descrizione più precisa si rimanda al paragrafo 6.9 e al glossario.
- (5) Le specie contraddistinte con il numero (5) nella colonna relativa alla conservabilità del seme, hanno semi ortodossi (v. Glossario) il cui contenuto di umidità deve oscillare tra 10 e 20% per una conservazione ottimale. Infatti si conservano meno bene rispetto ai semi ortodossi "tipici", che invece tollerano essiccazione tra il 5 e il 7%.
- (6) Epoca di semina: se non specificato, la semina autunnale non comporta il pretrattamento del seme; la semina primaverile, invece, spesso richiede l'impiego di seme non dormiente e cioè sottoposto prima della semina a pretrattamenti e pronto alla germinazione.
- (7) Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza): si indicano i trattamenti di presemina necessari a rimuovere la/e dormienza/e, con modalità e durata (v. 8.4). I pretrattamenti raccomandati sono fondamentalmente di tre tipi:
 - scarificazione (v. 8.4.4);
 - estivazione (o stratificazione calda o *preheating* o *warming*) (v. 8.4.2);
 - vernalizzazione (o stratificazione fredda o *prechilling*) (v. 8.4.1).

(DC) = indica specie con dormienza complessa. Nella tabella il termine è stato applicato convenzionalmente a quelle dormienze che necessitano di trattamenti o di combinazioni di più trattamenti di durata generalmente prolungata. Il concetto "dormienza complessa" è stato inoltre riferito alle dormienze che si presumono complesse in quanto non rispondono positivamente ai trattamenti più comunemente impiegati in vivaio. Per molte specie con dormienza complessa elencate in tabella è indicata la semina autunnale. Tale pratica non è sempre seguita dalla germinazione durante la primavera successiva. Le emergenze possono verificarsi, infatti, molto frequentemente durante la seconda o terza primavera. La semina autunnale, comunque, rappresenta la possibilità di rimuovere la/e dormienza/e grazie alle condizioni climatiche che caratterizzano le stagioni e vi si ricorre quando non si conoscono tecniche per facilitare la germinazione o non sono disponibili ambienti termocontrollati per l'esecuzione dei pretrattamenti.

(GF) = indica i semi di quelle specie che, nel cumulo di stratificazione fredda, possono germinare anche a temperature molto basse. Per questo motivo, quando questo tipo di semi viene sottoposto a pretrattamento, occorre controllare frequentemente il cumulo di vernalizzazione, soprattutto verso la fine del trattamento.

(DS) = indica i semi di quelle specie che, in seguito alla rimozione della dormienza primaria (quella presente al momento della dispersione naturale) attraverso trattamenti di presemina, possono riprendere la condizione di semi dormienti (dormienza secondaria) qualora il letto di semina mantenga temperature ‘elevate’ (intorno a +20°C) per periodi prolungati. La germinazione completa dei semi non dormienti di queste specie è generalmente favorita dall’alternanza di temperature (notti fredde e giorni caldi) nel terreno, come avviene in natura all’inizio della primavera. Le temperature relativamente alte di fine primavera-estate possono indurre dormienze secondarie che arrestano la germinazione.

Tabella 4 – Indicazioni per la raccolta, conservazione e semina dei semi di alberi e arbusti spontanei in Italia.

Tabella 4 – Indicazioni per la raccolta, conservazione e semina dei semi di alberi e arbusti spontanei in Italia

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Abies alba</i> Mill. (Abete bianco), <i>A. cephalonica</i> Link. (A. greco), <i>A. nordmanniana</i> Spach. (A. del Caucaso), <i>A. pinsapo</i> Boiss. (A. di Spagna)	estate	inizio autunno	la resinazione dei coni indica il momento in cui è possibile iniziare la raccolta	a freddo	- 7° C	ortodosso	Semina autunnale pacificata oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 3 - 4 sett.
<i>Acer campestre</i> L. (Acero oppio)	inizio autunno	autunno	il viraggio del seme al marrone indica il momento in cui è possibile iniziare la raccolta	a freddo	+ 2° C	Vedi (5) in Note per la Consultazione della Tabella	Semina autunnale oppure primaverile con seme trattato (DC) (GF)	Estivazione per 0-8 sett. Seguita da vernalizzazione per 12-24 sett.
<i>Acer monspessulanum</i> L. (Acero minore)	inizio autunno	autunno	l'abbondante fruttificazione non indica necessariamente qualità, talvolta vi è notevole presenza di seme vano	a freddo	+ 2° C	Vedi (5) in Note per la Consultazione della Tabella	come sopra	Vernalizzazione per 8-12 settimane
<i>Acer opalus</i> Mill. (Acero alpino)	inizio autunno	autunno	come sopra	a freddo	+ 2° C	Vedi (5) in Note per la Consultazione della Tabella	Semina autunnale oppure primaverile con seme trattato (GF)	Estivazione per 0-12 sett. seguita da vernalizzazione per 4-12 sett.
<i>Acer platanoides</i> L. (Acero riccio)	inizio autunno	autunno	il viraggio del seme al marrone indica il momento in cui è possibile iniziare la raccolta	a freddo	+ 2° C	Vedi (5) in Note per la Consultazione della Tabella	come sopra	Vernalizzazione per 4-6 settimane
<i>Acer pseudoplatanus</i> L. (Acero di monte)	inizio autunno	autunno	come sopra	a freddo	+ 2° C	Vedi (5) in Note per la Consultazione della Tabella	come sopra	Vernalizzazione per 4-10 settimane
<i>Alnus cordata</i> (Loisel.) Loisel. (Ontano cordato), <i>A. glutinosa</i> (L.) Gaertn. (O. comune), <i>A. incana</i> (L.) Moench (O. bianco), <i>A. viridis</i> (Chaix) DC. (O. verde)	inizio autunno	autunno	che non siano aperti i piccoli pseudostrobili	a freddo / a caldo	+ 2° C	ortodosso	Semina entro febbraio oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 4-6 settimane
<i>Amelanchier ovalis</i> Medik. (Pero corvino)	estate	estate	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale subito dopo la raccolta oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 8-12 settimane
<i>Arbutus unedo</i> L. (Corbezzolo)	autunno	autunno	la maturazione è scalare e protratta nel tempo	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale o primaverile, eventualmente con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 0-8 settimane

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Berberis vulgaris</i> L. (Crespino)	estate	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con semi vernalizzati	Vernalizzazione per 6-13 settimane (la previa estivazione potrebbe essere positiva)
<i>Betula pendula</i> Roth (Betulla verrucosa)	estate	fine estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 4-8 settimane
<i>Buxus sempervirens</i> L. (Bosso)	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	
<i>Carpinus betulus</i> L. (Carpino bianco)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Presenza di dormienza complessa. Semina di fine estate con semi ancora verdi oppure semina primaverile con seme maturo trattato (DC) (GF)	Estivazione per 2-8 sett. seguita da vernalizzazione per 12-14 sett.
<i>Carpinus orientalis</i> Mill. (Carpinella)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (DC) (GF)	Estivazione per 3-6 sett. seguita da vernalizzazione per 12-15 sett.
<i>Castanea sativa</i> Mill. (Castagno)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	recalcitrante	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato, generalmente all'aperto, dal momento della raccolta	
<i>Celtis australis</i> L. (Bagolaro)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato (GF)	Vernalizzazione per 8-12 settimane
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Carrubo)	estate	fine estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	scarificazione meccanica

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Cercis siliquastrum</i> L. (Albero di giuda)	estate	fine estate		a freddo		ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato (in alcuni casi può essere utile una breve vernalizzazione in seguito alla scarificazione)	scarificazione meccanica
<i>Colutea arborescens</i> L. (Vescicaria)	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	scarificazione meccanica
<i>Coriaria myrtifolia</i> L. (Coriaria, Sommacco provenzale)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C		Semina primaverile con seme pretrattato. Temperature alterne favoriscono la germinazione di seme non dormiente	Applicazione di soluzioni di acido giberellico (2,6 x 10 ⁻³)
<i>Cornus mas</i> L. (Corniolo)	estate	fine estate	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Presenta dormienza molto complessa. Semina autunnale (la germinazione avviene nella seconda primaverile) oppure primaverile con seme sottoposto a estivazione seguita da vernalizzazione; la scarificazione eseguita prima dell'estivazione può essere utile (DC)	Estivazione per 16 sett. seguita da vernalizzazione per 4-16 sett.
<i>Cornus sanguinea</i> L. (Sanguinella)	autunno	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione; può bastare la sola vernalizzazione	Vernalizzazione per 12-18 sett. (eventualmente preceduta da estivazione 0-8 sett.)
<i>Corylus avellana</i> L. (Nocciolo)	fine estate	inizio autunno	vari tipi di predazione	a freddo	+ 2° C	sub-ortodosso	Il seme non sopporta la disidratazione. Semina autunnale oppure primaverile, in entrambi i casi con nocciole vernalizzate, spesso all'aperto, dal momento della raccolta	Vernalizzazione

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Cotinus coggygria</i> Scop. (Sommacco selvatico)	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme dapprima scarificato meccanicamente o chimicamente e poi vernalizzato (DC)	Scarificazione meccanica o chimica (acido solforico 30-45 minuti) seguita da 4-8 (o più) sett. di vernalizzazione in relazione alla provenienza
<i>Crataegus</i> sp. pl. (Biancospino)	autunno	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	Vedi (5)	Semina di fine inverno - inizio primavera con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione, eventualmente dapprima scarificato (DC)	Estivazione per 4-16 sett. seguita da vernalizzazione per 12-20 sett
<i>Cytisus</i> sp.pl.	fine estate	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	scarificazione meccanica o chimica
<i>Elaeagnus angustifolia</i> L. (Olivagno)	autunno	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	di difficile conservazione (5)	Semina autunnale oppure di fine inverno - inizio primavera con seme sottoposto a estivazione (in alcuni casi non risulta necessaria)+vernalizzazione. Un trattamento alternativo consiste nell'immersione del seme in acqua corrente (+15°C) per 6 giorni seguita da stratificazione fredda per 4 settimane (DS)	v. epoca di semina
<i>Elaeagnus umbellata</i> Thunb. (Olivagno)	autunno	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	di difficile conservazione (5)	Semina autunnale o di fine inverno - inizio primavera con seme immerso in acqua corrente (+15°C) per 6 giorni e poi vernalizzato per 4 settimane (DS)	v. epoca di semina

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Emerus majus</i> Mill. estate	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato meccanicamente oppure immerso in acqua calda per 12-14 ore	scarificazione meccanica
<i>Erica arborea</i> L. (Erica arborea)	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	semina autunnale	Molte specie del genere Erica rispondono bene all'esposizione al fumo
<i>Euonymus europaeus</i> L. (Fusaria comune)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure di inizio primavera con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione.(DC)	Estivazione per 8-12 sett. seguita da vernalizzazione per 8-16 sett.
<i>Fagus sylvatica</i> L. (Faggio)	autunno	autunno		a freddo/ a caldo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure di fine inverno - inizio primavera con seme vernalizzato. Sono da evitare le semine primaverili tardive in quanto temperature del terreno elevate possono indurre dormienze secondarie (GF) (DS)	Vernalizzazione per 3-12 sett. (mediamente 8)
<i>Frangula alnus</i> Mill. (Frangola), <i>F. rupestris</i> (Scop.) Schur. (F. triestina)	estate	estate (F. rupestris), fine estate inizio autunno (F. alnus)	maturazione scalare (F. alnus)	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso		
<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl (Frassino a foglie strette)	autunno	autunno inverno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure di fine inverno - inizio primavera con semi sottoposti a pre-trattamenti per rimuovere la dormienza (DC) (GF) (DS)	Pretrattamenti possibili: estivazione (4 sett.) + vernalizzazione (4-8 sett.) oppure la sola vernalizzazione per 8-16 settimane

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Fraxinus excelsior</i> L. (Frassino maggiore)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Presenta dormienza complessa. Semina autunnale oppure primaverile con seme pretrattato (DC) (GF) (DS)	Estivazione (8-16 sett.) + vernalizzazione (8-16 sett.)
<i>Fraxinus ornus</i> L. (Orniello)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure di fine inverno – inizio primavera con seme sottoposto a pretrattamento	Estivazione (2-8 sett.) + vernalizzazione (8-15 sett.)
<i>Genista pilosa</i> L. (Ginestra tuberosa), <i>G. radiata</i> (L.) Scop. (G. stellata), <i>G. tinctoria</i> L. (G. minore)	estate	estate		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	Scarificazione meccanica o chimica (immersione in acidi con tempi variabili)
<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Olivello spinoso)	estate	fine estate		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 4-12 sett.
<i>Ilex aquifolium</i> L. (Agrifoglio)	autunno	inverno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	Vedi nota (5) in Note per la consultazione della Tabella	Semina autunnale oppure primaverile con seme pre-trattato (DC)	La dormienza, complessa e legata alla disseminazione omotocora, non è facile da rimuovere. Si suggeriscono lunghi periodi di estivazione (fino a 40 sett.) seguiti da vernalizzazione (fino a 24 sett.)
<i>Juglans regia</i> L. (Noce comune)	autunno	autunno		a freddo	+ 2°	sub-ortodosso	Il seme non sopporta la disidratazione spinta. Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato, generalmente all'aperto, durante tutto l'inverno	
<i>Juniperus communis</i> L. (Ginepro comune), <i>J. oxycedrus</i> L. subsp. <i>macrocarpa</i> (Sibth. et Sm.) Neim. (Ginepro coccolone)	fine estate	autunno	coesistenza nella stessa pianta di frutti di varie età e maturazione al momento della raccolta	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure di fine inverno – inizio primavera con seme trattato (DC)	Dormienze molto complesse che possono talvolta essere rimosse da estivazione seguita da vernalizzazione, in alcuni casi può bastare la sola vernalizzazione

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Laburnum alpinum</i> (Mill.) Bercht. et J. Presl (Maggiociondolo di montagna), <i>L. anagyroides</i> Medik. (M. comune)	autunno	autunno (<i>L. alpinum</i>), autunno inverno (<i>L. anagyroides</i>)		a freddo	+ 2°	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	Scarificazione meccanica o chimica
<i>Larix decidua</i> Mill. (Larice europeo)	autunno	inverno	si può correre il rischio di raccogliere anche coni vecchi	a caldo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale pacchiamata oppure primaverile, preferibilmente con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 3 - 8 settimane
<i>Laurus nobilis</i> L. (Alloro)	autunno	inverno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	Vedi (5) in note per la Consultazione della Tabella. Molti lo considerano recalcitrante	Semina autunnale subito dopo la raccolta (il seme perde rapidamente la vitalità) oppure primaverile con seme vernalizzato durante l'inverno	Vernalizzazione per 8-12 sett.
<i>Ligustrum vulgare</i> L. (Ligustro)	estate	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 4-12 sett.
<i>Lonicera alpigena</i> L. (Madreselva alpina), <i>Lonicera atrisca</i> Santi (Caprifoglio etrusco), <i>Lonicera nigra</i> L. (Caprifoglio nero), <i>Lonicera xylosteum</i> L. (Caprifoglio peloso)	estate	estate (<i>L. emusca</i>), estate-autunno (<i>L. nigra</i> e <i>L. xylosteum</i>) autunno (<i>L. alpigena</i>)	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Non ci sono molte informazioni sulla propagazione per seme; in genere si indica semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato (DC)	Vernalizzazione per 12 sett. (talvolta preceduta da estivazione per 8 sett.)
<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill. (Melo selvatico)	autunno	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina subito dopo la raccolta oppure primaverile con seme trattato. (DS)	Estivazione (2-4 sett.) + vernalizzazione (12-16 sett.)
<i>Mespilus germanica</i> L. (Nespolo)	fine estate	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina subito dopo la raccolta oppure primaverile con seme trattato. (DS) estivazione + vernalizzazione	Non ci sono molte informazioni sulla propagazione per seme
<i>Myrtus communis</i> L. (Mirto, Mortella)	fine estate	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina tardo autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 3-6 sett.

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Morus alba</i> L. (Gelso comune), <i>M. nigra</i> L. (G. nero)	primavera	fine primavera	varie predazioni	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale, previa immersione in acqua fredda per 3-4 giorni, oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 4-8 sett.
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (Carpino nero)	fine estate	autunno inverno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina a fine inverno - inizio primavera con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (DC) (GF) (DS)	Estivazione per 4-8 sett. seguita da vernalizzazione per 16-20
<i>Paliurus spina-christi</i> Mill. (Marruca)	fine estate	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 10-20 sett.
<i>Phillyrea angustifolia</i> L., (Fillirea) <i>P. latifolia</i> L. (Lilatro)	inizio autunno	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile, in entrambi i casi è meglio impiegare seme scarificato	meccanica o chimica (acido solforico 30 minuti)
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst. (Abete rosso)	inizio autunno	autunno		a caldo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme dapprima immerso in acqua fredda per 24-48 ore oppure vernalizzato	Vernalizzazione per 2-3 sett.
Genere <i>Pinus</i>	estate (autunno per <i>P. nigra</i> e <i>P. sylvestris</i>)	Da dic. a giu. <i>P. halepensis</i> Da nov. a maggio <i>P. pinea</i> Da ott. a giugno <i>P. pinaster</i> Estate <i>P. mugo</i> , autunno <i>P. cembra</i> e <i>P. nigra</i> , aut.-inverno <i>P. sylvestris</i>		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Per i pini mediterranei semina primaverile senza pretrattamenti, per gli altri semina primaverile con seme vernalizzato per 4-10 sett.	

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Pistacia lentiscus</i> L. (Lentisco)	fine estate	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato (2-3 settimane). In alternativa semina primaverile con seme scarificato meccanicamente	Vernalizzazione o scarificazione (v. Epoca di semina)
<i>Pistacia terebinthus</i> L. (Terebinto)	fine estate	autunno	In alcune annate la produzione di seme vano è elevatissima	a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 12 sett.
<i>Platanus orientalis</i> L. (Platano orientale)	estate	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina subito dopo la raccolta (inverno) oppure primaverile con seme vernalizzato	Vernalizzazione per 6-8 sett.
<i>Prunus amygdalus</i> Stokes (Mandorlo selvatico), <i>P. avium</i> L. (Ciliegio selvatico), <i>P. brigantina</i> Vill. (Pruno del delinatio), <i>P. cerasifer</i> Ehrh. (Ciliegio-susino), <i>P. cerasus</i> L. (Marasca), <i>P. laurocerasus</i> L. (Lauroceraso), <i>P. mahaleb</i> L. (Ciliegio canino), <i>P. padus</i> L. (Pado), <i>P. spinosa</i> L. (Prugnolo)			primavera (estate per <i>P. spinosa</i>) estate per tutti tranne <i>P. mahaleb</i> (inizio estate) e <i>P. spinosa</i> (fine estate-autunno)	possono essere predati dall'avifauna, in particolare modo <i>P. avium</i> e <i>P. mahaleb</i> lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina di fine inverno - inizio primavera (la germinazione è favorita dall'alternanza giornaliera di temperature del terreno) con seme sottoposto a pretrattamento per rimuovere la dormienza (DS)	Estivazione (2-6 sett.) + vernalizzazione (4-18 sett.), varia con la specie. Per <i>P. avium</i> si suggerisce vernal. 6 sett. + estiv. 2 sett. + vernal. 2 sett. + estiv. 2 sett. + vernal. 12 sett.; la germinazione è favorita da forti alternanze di temperature (3°C la notte, 20°C il giorno)
<i>Pyrus spinosa</i> Forssk. (Pera mandorlo), <i>P. pyrastrer</i> Medik. (P. selvatico)	autunno	autunno	frequente la predazione da avifauna	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina di fine inverno - inizio primavera (la germinazione è favorita dall'alternanza giornaliera di temperature del terreno) con seme sottoposto a pretrattamento per rimuovere la dormienza (DC) (DS)	Estivazione (2-4 sett.) + vernalizzazione (12-18 sett.)
<i>Quercus</i> sp. pl.	fine estate	autunno		a freddo	+ 2° C	recalcitrante	Il seme non sopporta la disidratazione. Semina autunnale subito dopo la raccolta oppure primaverile con seme vernalizzato, generalmente all'aperto, dal momento della raccolta	

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Rhamnus</i> sp. pl.	estate	in genere fine estate - inizio autunno	Predazioni varie. In alcune annate la produzione di seme vano è elevatissima	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	I <i>Rhamnus</i> mostrano dormienze piuttosto complesse che possono variare con l'annata e la provenienza. Semina autunnale oppure primaverile con seme pretrattato. (DC)	Per <i>Rhamnus alpinus</i> si suggeriscono 12-16 settimane di vernalizzazione
<i>Rosa</i> sp. pl.	fine estate	autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina di fine inverno - inizio primavera con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione. L'aggiunta nel substrato di stratificazione di sostanze usate come starter del compostaggio accorcia la durata del trattamento perché agiscono degradando l'endocarpo carnoso. I trattamenti non sono sempre efficaci (DC) (GF) (DS)	Estivazione (8-24 sett.) + vernalizzazione (8-24 sett.)
<i>Ruscus aculeatus</i> L. (Pungitopo)	inverno	inverno-primavera		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	La specie mostra una dormienza molto complessa e a tutt'oggi non si conoscono metodi veramente efficaci per stimolare la germinazione. Semina primaverile con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (anche per più cicli) (DC)	Estivazione (4-8 sett.) + vernalizzazione (8-12 sett.)
<i>Sambucus</i> sp. pl.	estate	estate	frequente la predazione da avifauna (in particolare <i>S. nigra</i>)	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale con seme non trattato oppure primaverile con seme trattato	Per <i>S. nigra</i> vernalizzazione (8-9 sett.), gradisce temp. di 20°C per germinare. Per <i>S. racemosa</i> vernalizzazione (12-24 sett.) preferisce temperature alternate per germinare

Binomio scientifico e nome volgare	Epoca in cui stimare l'entità e qualità della fruttificazione	Epoca di raccolta	Elementi da considerare per procedere alla raccolta (1)	Tipo di lavorazione del seme (2)	Temperatura di conservazione (3)	Conservabilità del seme (4)	Epoca di semina (6)	Pretrattamenti (se necessari a rimuovere la dormienza) (7)
<i>Sorbus</i> sp. pl.	estate	fine estate - autunno (S. ariaria, S. domestica), autunno (S. aucuparia, S. torminalis)	varie predazioni (in particolare su <i>S. aucuparia</i> e <i>S. torminalis</i>)	lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina subito dopo la raccolta oppure a fine inverno – inizio primavera (l'alternanza giornaliera di temperature favorisce la germinazione mentre le temperature costanti elevate inducono dormienza secondaria) con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (o alla sola vernalizzazione) (DC) (DS)	Estivazione (0-4 sett.) + vernalizzazione (12-16 sett.)
<i>Spartium junceum</i> L. (Ginestra odorosa)	estate	estate autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina primaverile con seme scarificato	Scarificazione
<i>Staphylea pinnata</i> L. (Bossolo)	autunno	autunno		a freddo	+ 2° C	ortodosso	Semina subito dopo la raccolta oppure primaverile con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (DC)	Estivazione (12 sett.) + vernalizzazione (12 sett.)
<i>Taxus baccata</i> L. (Tasso comune)	fine estate	fine estate inizio autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	Vedi nota (5) in Note per la consultazione della Tabella	Semina autunnale (la germinazione avviene durante la 2a primavera) oppure primaverile con seme sottoposto a trattamento (non sempre efficace) (DC)	Estivazione (12-28 sett.) + vernalizzazione (8-16 sett.)
<i>Tilia</i> sp. pl.	autunno	autunno o fine autunno		a freddo	+ 2° C	Vedi nota (5) in Note per la consultazione della Tabella	Presenta dormienza complessa. Se non si impiega seme trattato, la germinazione si protrae per 3 anni. Semina primaverile con seme trattato (estivazione + vernalizzazione) (DC) (GF)	Estivazione (16 sett.) + vernalizzazione (14-18 sett.)
<i>Ulmus</i> sp. pl.	primavera	primavera		a freddo	+ 2° C	In natura perdono rapidamente la vitalità; di difficile conservazione	I semi di olmo non hanno dormienza. Semina immediatamente dopo la raccolta (primavera)	
<i>Viburnum</i> sp. pl.	estate (<i>V. lantana</i> e <i>V. opulus</i>), autunno (<i>V. tinus</i>)	fine estate autunno		lavorazione frutti carnosì	+ 2° C	ortodosso	Semina autunnale oppure primaverile con seme sottoposto a estivazione + vernalizzazione (DC) (GF)	v. epoca di semina

10.2 Come individuare le esigenze ecofisiologiche della germinazione?

Conservare e gestire correttamente il germoplasma significa anche conoscere le strategie che le specie impiegano per la loro perpetuazione. In particolare interessa la propagazione sessuale, perché assicura la massima diversità genetica e, in questo ambito, le esigenze di natura ecofisiologica che i semi debbono soddisfare per germinare.

Davanti a specie rare o endemismi minacciati di estinzione, talvolta indispensabili per restaurare e consegnare alle future generazioni habitat di particolare pregio, non è raro scoprire la totale mancanza di conoscenze sulla loro moltiplicazione.

Un'importante condizione che va accertata per procedere alla propagazione artificiale di piante minacciate o di particolare interesse è l'esistenza di dormienza (v. 8.3) seminale al momento della disseminazione. E' bene ricordare che i semi appartenenti a specie spontanee in regioni temperate fredde del mondo si sono adattati a tali ambienti richiedendo spesso la permanenza nel terreno durante un inverno oppure durante un estate ed un inverno, condizioni che rimuovono naturalmente la dormienza e consentono la germinazione.

Le incognite appena poste possono, in molti casi, essere chiarite da studi mirati che tendono a fare luce sulle caratteristiche del ciclo riproduttivo di una determinata specie e sui rapporti con le specifiche condizioni ambientali che provocano la germinazione (ecofisiologia della germinazione). Questo tipo di approccio alla conoscenza scientifica della propagazione è iniziato negli Stati Uniti negli anni '90 e le procedure sono state progressivamente migliorate (Baskin *et* Baskin, 1998; Piotto *et* Crosti, 2005). In questi studi si debbono impiegare semi freschi (disseminati o raccolti da poco), perché il seme destinato alla conservazione a medio-lungo termine può talvolta modificare le proprie caratteristiche. E' comunque importante capire se lo stoccaggio implica qualche tipo di cambiamento nella fisiologia dei semi (es.: induzione o rimozione di dormienza).

Per le prime indicazioni sul tipo di dormienza che caratterizza i semi di una data specie, potrebbe essere di aiuto tener conto del modo con cui si opera la disseminazione della pianta d'interesse. Conoscere questo aspetto è utile per intuire la deperibilità seminale, nonché il tipo di dormienza della specie, soprattutto se l'informazione può completarsi con l'osservazione della stagione in cui germinano la maggior parte dei semi così dispersi. Da queste premesse, per affinità con il comportamento di specie note, possono sorgere risposte. Alcuni esempi di dormienza legata alla disseminazione (ma non necessariamente da essa provocata) possono offrire chiarimenti:

- molte specie che gravitano in ambienti fluviali (es: *Populus*, *Salix*, *Ulmus*, etc.) disseminano in primavera e producono generalmente semi non dormienti che germinano subito (ma sono di difficile conservabilità);
- i semi di specie che disseminano in autunno e che germinano durante la primavera successiva hanno una dormienza che si rimuove generalmente con un periodo di freddo umido (l'inverno a cui sono sottoposti in condizioni naturali);
- i semi contenuti in frutti da colori vivaci o lucidi sono frequentemente ingeriti e ridisseminati in autunno-inverno da uccelli o da piccoli mammiferi, mostrano dormienze molto complesse e difficili da rimuovere (es: *Cornus*, *Crataegus*, *Ilex*, *Viburnum*, etc.);
- i semi che disseminati in tarda primavera-estate, germinano durante la seconda primavera successiva alla dispersione, mostrano generalmente dormienze morfo-fisiologiche che necessitano di condizioni caldo-umide (estate), seguite da periodi freddo-umidi (inverno) per consentire la germinazione (es.: molte *Rosaceae*);
- i semi che vengono dispersi in primavera o in estate e germinano durante l'autunno o l'inverno

successivo, mostrano una dormienza rimovibile da un periodo di caldo secco (estate o incendi) (es.: numerose *Cistaceae*).

La metodologia sviluppata negli Stati Uniti da Baskin *et* Baskin (2003) per individuare le esigenze richieste dai semi per germinare risulta di applicazione relativamente facile (anche se con limitazioni date dalle attrezzature scientifiche disponibili) e sufficientemente plastica da essere adattata a specie caratteristiche di climi diversi. Inizialmente queste prove consistevano nel monitoraggio delle fasi fenologiche che succedono la dispersione dei semi, attraverso una semina operata subito dopo la disseminazione in ambienti naturali con accorgimenti per evitare danni da predazione. Estremamente importante era confinare i semi in sacchetti di tessuto non tessuto e inserirli in piccole gabbie di metallo (per meglio identificare i luoghi di deposizione e per prevenire la predazione). Periodicamente il materiale veniva dissotterrato e osservato per stabilire l'andamento della germinazione. E' stata successivamente sviluppata una metodologia analoga ma realizzata in ambienti controllati (armadi termostatici) che risultano meno esposti a situazioni aleatorie e che forniscono la possibilità di mantenere le condizioni stabili per poter arrivare a determinare la temperatura o la sequenza di temperature necessarie a rimuovere la dormienza in specie delle quali si ignora l'ecofisiologia della germinazione.

Per impostare gli armadi termostatici o altri ambienti termo-controllati impiegati per le prove di germinazione, si scelgono una serie di temperature, costanti o con alternanze giornaliere, che simulano le condizioni termiche dell'aria nelle diverse stagioni dell'anno nella regione d'interesse. Generalmente si prevedono due successioni (tab. 5) che, seppur basate sul medesimo susseguirsi di stagioni, partono l'una "in inverno" e l'altra "d'estate". I semi imbibiti si sottopongono in parallelo ad entrambi i percorsi e sono monitorati finché avviene la germinazione.

In relazione alla disponibilità di semi, la prova può essere condotta al buio e/o con fotoperiodo. La durata del fotoperiodo va definita dal ricercatore ma è generalmente compresa tra 8 e 14 ore giornaliere. La luce è inserita durante la fase calda del ciclo termico, o in una parte qualsiasi della giornata quando non è prevista l'alternanza giornaliera di temperature (ad esempio durante l'inverno a 5°C costanti).

Per ciascuno dei regimi termici impiegati nelle prove si prevedono ripetizioni che saranno condotte sempre alle stesse condizioni di temperatura e di luce per tutta la durata della prova (testimoni). I semi che, soggetti costantemente a un determinato regime termico, non germinano entro 30-40 giorni sono considerati dormienti.

Il ricercatore aggiusterà le temperature dei cicli per avvicinarle il più possibile a quelle che si registrano nell'areale della specie studiata. In relazione alla disponibilità delle attrezzature alcune stagioni possono essere eliminate allorquando ci siano limitazioni nella disponibilità di armadi termo-regolati: si può prescindere, ad esempio, dall'inizio primavera e dalla fine autunno avendo però l'accortezza di allungare di altre quattro settimane i periodi corrispondenti alla fine primavera ed all'inizio autunno (tab. 5). In questo modo si avranno solo tre diversi regimi termici, che possono essere condotti in un solo armadio in cui si impostano successivamente i cicli, oppure in tre diversi armadi, ciascuno con un ciclo fisso, a cui vanno trasferiti i semi man mano che completano i periodi simulanti le stagioni. Se si sceglie di duplicare l'esperimento conducendolo anche al buio, non occorrono altri armadi termostatici ma basterà avvolgere i contenitori impiegati per alloggiare i semi con film di alluminio. La lettura dei semi germinati si svolge settimanalmente o con frequenze più elevate; nel caso del trattamento al buio il conteggio dovrebbe effettuarsi sotto luce modificata rispetto allo spettro visibile.

Tabella 5 - Schema per l'impostazione di prove sperimentali tese alla determinazione della temperatura o del ciclo di temperature necessarie a rimuovere la dormienza nei casi in cui le peculiarità di questo carattere genetico non siano note (modificata da Baskin *et Baskin*, 2003).

Durata delle fasi del trattamento (settimane)	Successioni parallele di cicli termici		Testimoni			
	4 ripetizioni da 25 semi (A)	4 ripetizioni da 25 semi (B)	4 ripetizioni da 25 semi (C)	4 ripetizioni da 25 semi (D)	4 ripetizioni da 25 semi (E)	4 ripetizioni da 25 semi (F)
12	5°C inverno	25/15°C estate	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C inizio primavera	20/10°C inizio autunno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fine primavera	15/6°C fine autunno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C estate	5°C inverno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C inizio autunno	15/6°C inizio primavera **	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fine autunno	20/10°C fine primavera **	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	5°C inverno	25/15°C estate	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C inizio primavera *	20/10°C inizio autunno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fine primavera *	15/6°C fine autunno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C estate	5°C inverno	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C inizio autunno	15/6°C inizio primavera	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fine autunno	20/10°C fine primavera	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

10.2.1 Interpretazione dei risultati

Se la specie ha bisogno del solo freddo umido invernale per rimuovere la dormienza e di temperature più elevate per germinare, i semi che partono con la fase fredda (colonna A) germineranno nel periodo simulante la stagione successiva (primavera), mentre i semi della colonna B germineranno durante la loro quinta o sesta fase (anche queste rappresentano la primavera), solo dopo che saranno passati attraverso un periodo invernale. Non si osserverà germinazione nei controlli a temperatura costante. Una variante a questo caso classico potrebbe essere fornita dai semi che sono capaci di germinare a temperature molto basse una volta soddisfatte le loro necessità di freddo, in tal caso si potrebbe osservare germinazione sia alla fine della prima fase della colonna A che della quarta fase della colonna B, entrambe a basse temperature, oppure dopo un certo periodo di permanenza a 5°C costanti (colonna C).

I semi che hanno bisogno, in sequenze successive, di caldo umido (estate) + freddo umido (inverno) per rimuovere la dormienza, germineranno durante la seconda primavera se sottoposti alla sequenza prevista in colonna A (tab. 5, evidenziato con un asterisco). Questo è quanto avviene normalmente in natura per molte *Rosaceae* e per il frassino maggiore (*Fraxinus excelsior* L.). Se, invece, si parte con la fase calda (colonna B), la germinazione si osserva appena completato il fabbisogno di caldo umido + freddo umido (tab. 5, evidenziato con due asterischi). Al fine dell'impostazione di eventuali futuri trattamenti si deve tenere conto che i semi che hanno quest'ultimo tipo di dormienza (detta morfo-fisiologica), hanno bisogno di passare progressivamente prima attraverso la fase calda, per completare lo sviluppo dell'embrione, e solo dopo per la fase fredda che agisce efficacemente dal punto di vista fisiologico solo se l'embrione ha raggiunto la maturità.

E' evidente come una procedura parallela, in cui le successioni termiche partono con stagioni diverse (inverno ed estate), consenta di ottenere risposte più rapide.

I risultati di questi studi potrebbero avere bisogno di approfondimenti per determinare, ad esempio, la durata adeguata dei cicli termici. Nello stesso modo può essere utile, al fine di ottimizzare l'entità e simultaneità della germinazione, l'individuazione della temperatura di germinazione ottimale da

applicare dopo la rimozione della dormienza. Le temperature ideali per la germinazione sono a volte più basse di quanto si potrebbe prevedere, soprattutto in ambienti mediterranei e temperati dove i momenti freschi (autunno) sono anche i più umidi dell'anno e rappresentano perciò l'epoca ideale per la germinazione di molte specie.

La metodologia per individuare le esigenze ecofisiologiche della germinazione appena descritta consente di ottenere informazioni abbastanza precise in tempi generalmente compresi tra 12 e 14 mesi, ma gli aggiustamenti da apportare alla procedura sono numerosi e rimangono a giudizio del ricercatore, tenuto conto della disponibilità di semi, del tipo, quantità e capacità degli ambienti termo-controllati e della precisione delle informazioni che si pretende ottenere.

10.3 Raccolta, conservazione e gestione del germoplasma delle Salicacee

Pioppi e salici possono essere facilmente propagati sia per seme sia per via vegetativa, ma è soprattutto la facilità di propagazione mediante talee legnose ad aver condizionato nel tempo i programmi di miglioramento genetico e l'evoluzione delle tecniche colturali. La possibilità di raccogliere dai migliori genotipi spontanei individuati lungo i fiumi materiale vegetativo da propagare e coltivare con successo, ha sovente fatto dimenticare agli agricoltori che, come per tutte le specie agrarie e forestali, anche in pioppicoltura una gestione sostenibile delle risorse genetiche e il progresso genetico nel lungo periodo può essere assicurato solo attraverso la conservazione di una elevata biodiversità e favorendo la ricombinazione genica che segue la riproduzione sessuale (Bisoffi *et al.*, 1999).

La variabilità genetica può essere mantenuta sia attraverso la tutela degli habitat naturali (riserve genetiche primarie o unità naturali di conservazione *in situ*), sia mediante la costituzione di riserve secondarie (collezioni *ex situ*) (fig. 41). In generale, considerata l'elevata variabilità presente nel genere *Populus*, l'obiettivo principale dovrebbe essere quello di favorire l'evoluzione delle varie specie attraverso la protezione delle popolazioni naturali. Parte della variabilità genetica esistente nelle formazioni spontanee, una volta individuata, raccolta e caratterizzata, può essere efficacemente conservata propagando i genotipi in archivi clonali e in arbo-



Figura 41 – Arboreto da seme di *Populus nigra*.
(foto: L. Vietto)

reti di collezione; si tratta di attività che, per la loro realizzazione e gestione, richiedono disponibilità di terreni agricoli e notevoli risorse umane e finanziarie, ma che da sole non sono sufficienti ad assicurare una gestione ottimale delle risorse genetiche, anche per i rischi di tipo fitosanitario a cui possono essere soggette. Una forma più economica di conservazione del germoplasma, non alternativa, ma che al contrario ben si integra con i metodi tradizionali di conservazione è la creazione di banche di polline e di seme e di colture di tessuti in vitro. Questo metodo facilita per di più lo spostamento di risorse genetiche tra le diverse istituzioni, limitando i problemi di carattere fitosanitario che si verificano con lo scambio di talee, barbatelle o altro materiale vegetale simile.

Tra le varie specie di pioppo, nel continente europeo riveste particolare importanza *Populus nigra* L. (Pioppo nero). Per questa specie in alcune aree del medio-basso corso del Danubio sono stati attiva-

ti progetti coordinati di conservazione *in situ*, ma si tratta in genere di programmi di protezione generica di ecosistemi fluviali, senza misure specifiche per una specie che è considerata a rischio di scomparsa in buona parte dell'Europa occidentale, Italia compresa. Manca ancora una informazione conoscitiva di tipo inventariale sulla localizzazione delle formazioni naturali, che potrebbe costituire la premessa fondamentale per avviare un'opera di conservazione di tipo sistematico, anche se ormai difficilmente applicabile su vasta scala per l'estrema frammentazione e alterazione degli ambienti fluviali di origine (Cagelli, 1998). Mai come in questo caso, trattandosi di una specie pioniera simbolo degli ambienti fluviali e allo stesso tempo di importanza strategica per i programmi di *breeding* a livello internazionale, è di fondamentale importanza la costituzione di riserve genetiche secondarie. Nell'ambito dell' *European Forest Genetic Resources Program* (http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/euf_home.asp) il *Populus nigra* Network ha coordinato varie iniziative volte alla creazione di collezioni di germoplasma di sicura origine e identità in vari paesi europei, tra cui una *core-collection* che comprende genotipi rappresentativi dell'intero areale di distribuzione della specie e uno specifico database che raccoglie informazioni su oltre 3300 genotipi mantenuti in 20 nazioni ed è a supporto dell'intera attività (Vietto *et al.*, 2005). Per il Pioppo nero, grazie all'elevata disponibilità di conoscenze sulle strategie di conservazione (Léfévre *et al.*, 2001), in alcuni paesi come Italia (Vietto *et al.*, 2004) e Belgio (Vanden Broeck *et al.*, 2002) è stata avviata una "conservazione di tipo dinamico". Si tratta di una forma attiva di conservazione a lungo termine che consiste nella costituzione, in siti idonei alla rinnovazione naturale, di unità artificiali di conservazione *in situ* assimilabili ad arboreti da seme (fig. 41) caratterizzati da elevata variabilità genetica e che, attraverso la riproduzione sessuale e l'evoluzione di complessi genici come risposta a modificazioni ambientali, siano esse climatiche o biotiche, potranno assicurare la sopravvivenza della specie negli ambienti fluviali di origine.

10.3.1 Propagazione agamica

L'attività di propagazione agamica si svolge generalmente durante il riposo vegetativo. Il periodo migliore per la raccolta del materiale da impiegare per la produzione di talee legnose è quello di fine inverno (febbraio-marzo). A questo scopo si utilizzano in genere barbatelle, astoni o rami di un anno di età, da cui possono essere facilmente prodotte talee di lunghezza standard (circa 20 cm) con un buon numero di gemme laterali e particolarmente adatte al trapianto con mezzi meccanici. Nel caso in cui la moltiplicazione debba iniziare da alberi adulti, si prelevano in genere branche di 3-4 anni di età, possibilmente tagliando i rami più vigorosi presenti nella parte superiore della chioma; le talee prodotte dovranno avere una lunghezza maggiore (circa un metro) e soprattutto portare gemme latenti alla base dei rami laterali o immediatamente di sotto all'anello che separa l'accrescimento di due annate successive ed essere piantate manualmente interrandoole per almeno 2/3 della loro lunghezza. Nella maggior parte delle specie di pioppo e salice, con la propagazione clonale rimangono pressoché inalterate alcune caratteristiche importanti come capacità di radicamento, portamento, accrescimento, forma e vigore, e l'impianto di talee in appositi barbatellai o vivai consente di ottenere piante caratterizzate dalle stesse capacità di crescita e di sviluppo delle piante madri. Per quanto riguarda alcuni caratteri morfologici e fisiologici, soprattutto nel caso di propagazione di esemplari adulti, si può invece manifestare una certa variabilità intraclonale in relazione all'età del capostipite, delle condizioni edafico-ambientali in cui è cresciuto e della porzione di chioma da cui sono stati prelevati i rami destinati alla moltiplicazione (Frison, 1996).

Tenuto conto che le *Salicaceae* sono piante dioiche, nell'effettuare raccolte di germoplasma si deve tendere a una equa percentuale di materiale agamico proveniente da piante di entrambi i sessi (Lan-dis *et al.*, 2004).

Il materiale destinato alla propagazione (rami o barbatelle) e le talee prodotte possono essere conservate per 1-2 mesi in celle frigorifere a temperature comprese tra -2 C° e + 4 C°, eventualmente chiuse in sacchetti di nylon o, nel caso di grandi quantitativi di materiale, messe in cassoni protetti da sacchi in iuta per prevenire un'eccessiva disidratazione. Talvolta si effettua un trattamento chimico con ditiocarbammati. Nella necessità di dover eseguire spedizioni di materiale che richiedono tempi lunghi per lo sdoganamento e la consegna, è buona norma proteggere le estremità delle talee con appositi mastici, cera, o semplicemente confezionare le talee in sacchetti chiusi sotto vuoto.

La capacità di radicamento dipende soprattutto da fattori genetici variabili da specie a specie, ma è anche condizionata da fattori morfologici, fisiologici, ambientali, sovente interagenti e concomitanti tra loro, e tende in genere a ridursi con l'aumentare dell'età del materiale utilizzato per la propagazione. Prima di procedere all'impianto è buona pratica idratare il materiale immergendolo in acqua per un periodo di 10-15 giorni in dipendenza dello stato di idratazione iniziale e soprattutto quando nel corso della stagione vegetativa si sono verificati stress idrici prolungati.

Nel caso di *Populus nigra* le talee radicano con notevole facilità; quando il materiale di partenza ha due o più anni di età è in ogni modo sempre opportuno preparare talee di lunghezza maggiore (30-50 cm) rispetto a quella standard. I soggetti di *Populus deltoides* Marshall (Pioppo nero americano) presentano invece una attitudine al radicamento di molto inferiore rispetto a quella di *P. nigra*, con notevoli differenze tra differenti genotipi che sono particolarmente negative soprattutto negli individui caratterizzati da cicli vegetativi piuttosto lunghi e che comportano scarsa lignificazione dei tessuti e di conseguenza un'elevata predisposizione alla disidratazione. La maggior parte degli ibridi di *Populus xcanadensis* Mönch, cloni di pioppo comunemente indicati con il termine di "euramericani" perché ottenuti da incroci tra soggetti femminili di *P. deltoides* e soggetti maschili di *P. nigra*, sono in genere caratterizzati da ottime capacità di radicazione, attitudine che è ereditata dal parentale maschile. La maggiore o minore capacità di radicamento condiziona fortemente anche l'attecchimento del materiale vivaistico in pioppicoltura. E' per questo motivo che, in occasione dell'impianto di un pioppeto, oltre a ridurre al minimo il periodo che intercorre tra l'estirpo e la messa a dimora delle pioppelle, le piantagioni di cloni euramericani sono di norma costituite in pieno inverno (novembre-febbraio), mentre per le piantagioni di *P. deltoides* o di cloni fenotipicamente simili a questa specie, l'impianto in genere è fatto in epoca più tardiva (febbraio-marzo), anche per limitare un'eccessiva disidratazione del materiale dopo la messa a dimora. In *Populus alba* L. (Pioppo bianco) la capacità rizogena e l'attecchimento sono molto variabili tra genotipo e genotipo, ma anche in questo caso i risultati possono essere migliorati aumentando la lunghezza delle talee (30-50 cm). Al contrario, molto limitate sono le possibilità di propagazione per talea di *Populus tremula* L. (Pioppo tremolo), *Populus tremuloides* Michaux e *Populus grandidentata* Michaux, fenomeno probabilmente legato alla mancanza di primordi radicali sui rami. Le possibilità di propagazione vegetativa dei pioppi tremoli sono in sostanza limitate all'impiego di polloni radicali che possono essere facilmente prelevati su radici prossime alla superficie. I polloni radicali sono impiegati con successo anche per ottenere talee verdi nel periodo estivo (giugno-luglio); in questo caso le talee, che sono costituite da una porzione di radice e una parte di alcuni centimetri di germoglio con foglie, devono essere propagate in condizioni di temperatura e umidità controllate, su substrato sterile e con l'impiego di sostanze auxiniche. Per quanto riguarda altre specie minori di pioppo, la capacità rizogena è molto variabile da specie a specie. *Populus euphratica* Olivier, *P. lasiocarpa* Olivier, *P. heterophylla* L. presentano in genere notevoli difficoltà di radicamento. Al contrario, alcune specie americane quali *P. trichocarpa* T & G e *P. balsamifera* L., e altre tipicamente asiatiche come *P. laurifolia* Ledebour, *P. maximowiczii* A. Henry, *P. koreana* Rehder, *P. simonii* Carrière e *P. yunnanensis* Dode si possono propagare facilmente per la buona capacità rizogena delle talee (Frison, *op. cit.*).

La tecnica dell'innesto può rappresentare una valida alternativa per i cloni di pioppo che hanno scarsa attitudine ad essere propagati per talea. L'utilizzo a fini commerciali è limitato quasi esclusivamente a soggetti di *P. tremula* che sono generalmente innestati, a zufolo o a gemma, su piantine di un anno della stessa specie o di Pioppo bianco. In attività scientifico-sperimentali da tempo si pratica con successo l'innesto per approssimazione (fig. 42).

Questo tipo di innesto è realizzato durante la stagione vegetativa (agosto), innestando sul portainnesto (piantine allevate in vaso, generalmente del clone I-214, *P. x canadensis*) le marze (rami fiorali di soggetti femminili prelevati da soggetti adulti,

fig. 43) destinate all'impollinazione controllata nella primavera successiva. Per indurre fioriture anticipate può anche essere usato l'innesto a doppio spacco inglese.

Per la conservazione a medio termine di cloni caratterizzati da particolare interesse commerciale sono disponibili procedure di micropropagazione *in vitro* (Lubrano, 1992), tecnica che, rispetto alla propagazione vegetativa per talea, consente maggiore rapidità di propagazione, possibilità di conservazione del materiale per lunghi periodi e, non ultimo, utilizzo per scambi di materiale senza incorrere in problematiche di natura fitosanitaria. In seguito a promettenti risultati ottenuti con altre colture legnose, recentemente è stata provata anche su pioppo la crioconservazione. Mediante la tecnica della vitrificazione seguita dall'immersione diretta in azoto liquido (-196°C), con apici gemmari o tessuti embrionici è stata ottenuta un'alta percentuale di sopravvivenza in *P. alba* (82%), soddisfacente in *P. canescens* Sm. (54%), scarsa in *P. nigra* (22%) (Lambardi, 2002).



Figura 42 – Innesto per approssimazione.
(foto: L. Cagelli)



Figura 43 – Raccolta dei rami fiorali con capsule prossime alla disseminazione.
(foto: C. Lioia)

10.3.2 Propagazione gamica

La disponibilità di un'elevata variabilità genetica è condizione essenziale per una buona gestione delle risorse di germoplasma oltre che per la realizzazione dei programmi di miglioramento genetico. In questo ambito, se scambi di seme consentono di costituire popolazioni di base caratterizzate da ampia variabilità, scambi di polline permettono l'immediata realizzazione di incroci con soggetti femminili di particolare interesse e l'avviamento in anticipo di programmi di incrocio già impostati.

Numerose sono le ricerche effettuate per valutare la vitalità e la facoltà germinativa del polline e del seme, per conoscere le condizioni ottimali necessarie alla conservazione a lungo termine e soprattutto per individuare l'influenza dei diversi fattori che possono incidere negativamente sulla facoltà germinativa e sulla struttura genetica nel tempo.

10.3.3 Raccolta e conservazione semi

In natura e nelle condizioni climatiche della Pianura Padana, la fioritura inizia generalmente verso i primi di marzo. In ambiente controllato (es.: serra) la fioritura del materiale raccolto in campo può essere provocata in anticipo durante tutto il periodo di riposo vegetativo e la rapidità nella comparsa degli amenti aumenta se il materiale è prelevato verso la fine del periodo invernale, soprattutto se i rami fiorali subiscono preventivamente un periodo di condizionamento a +4 C° per circa un mese.

I migliori soggetti produttori di seme sono gli esemplari adulti cresciuti isolati. Il pioppo è in grado di fiorire e produrre seme già all'età di 5-10 anni, talvolta, in particolari condizioni di stress, anche in epoca più precoce. I semi (fig. 44) sono molto piccoli e in un grammo sono contenuti mediamente 1000 semi, peso e volume variano considerevolmente da specie a specie: si passa da valori di 442.000 – 3.300.000 semi per Kg nel caso di *P. deltoides*, 1.000.000 - 1.100.000 semi per Kg per *P. nigra* e 1.600.000 - 1.800.000 semi per Kg per *P. alba*, per raggiungere valori di 5.900.000 – 19.700.000 nel caso di *P. tremula* (Piotto, 1992; Piotto et Di Noi, 2001). Per quanto riguarda i salici, in genere i semi sono molto più piccoli, mediamente 12.000.000 – 15.000.000 di semi per Kg nel caso di *Salix alba* L.

La raccolta dei semi deve essere eseguita il più vicino possibile al momento della disseminazione naturale, ossia nella fase di apertura delle capsule; queste ultime, se raccolte troppo prematuramente, forniscono semi caratterizzati da scarsa vitalità. In ogni caso il periodo che intercorre tra la raccolta e l'inizio della fase di conservazione deve essere il più breve possibile. Al fine di prevenire possibili deterioramenti, i frutti devono essere disposti in strato sottile e lasciati asciugare a temperatura ambiente (1-2 giorni), in modo da poter raccogliere i semi e separarli dal cotone nel volgere di una settimana. Lo scotonamento (fig. 45) di lotti di seme di *P. nigra* o di *P. deltoides* può essere effettuato con buoni risultati usando un getto di aria compressa e una serie di setacci con maglie di 1,6 mm.



Figura 45 - Scotonamento di semi di *Populus nigra*. (foto: C. Lioia)



Figura 44 – Semi di pioppo nero. La lunghezza dei semi è di 3 mm circa. (foto: L. Cagelli)

La facoltà germinativa è di norma elevata (80%-90%), ma può peggiorare notevolmente in sole 3-4 settimane, soprattutto se i semi vengono lasciati esposti all'aria alcuni giorni dopo la deiscenza dalle capsule. I semi di pioppo germinano molto velocemente: in condizioni favorevoli, se il seme è fresco la germinazione può avvenire in sole 6-12 ore. Un rapido test di germinazione (fig. 46) può essere eseguito disponendo i semi (n. 100 per tre repliche) su dischi di carta da filtro imbibiti di acqua deionizzata e posti in capsule Petri a +25 C°, valutando la germinabilità dopo 7-10 giorni secondo il test proposto da Simak (1980). Per determinare con maggior certezza i risultati dei test di germina-

zione è anche possibile realizzare un test colorimetrico al fine di valutare l'effettiva vitalità del lotto di semi (fig. 47). Anche se generalmente l'epicotile emerge dai tegumenti seminali con una certa rapidità, occorre considerare che anche da semi apparentemente normali è possibile ottenere un elevato numero di germinelli anomali, pur con una notevole variabilità tra specie e specie e anche tra genotipi della stessa specie. Per semine consistenti si impiegano generalmente contenitori alveolari di 20 cm³ di capacità riempiti con substrato torboso e sistemati in serre climatizzate a 18°-20°C; in queste condizioni l'emergenza delle plantule si completa in una settimana circa (Cason, *in verbis*).

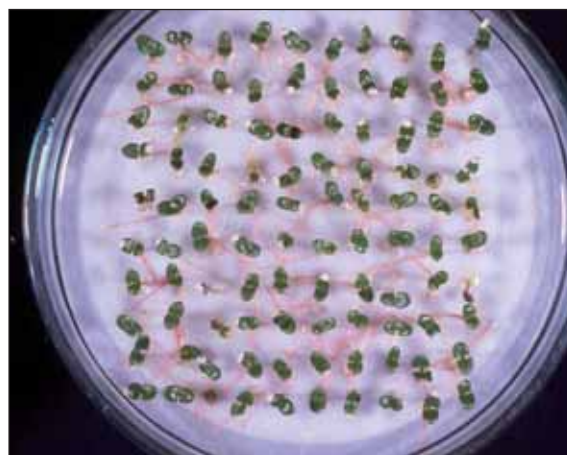


Figura 46 - Test di germinazione su semi di *Populus nigra*. (foto: L. Cagelli)

Molti sono i fattori che influiscono nel tempo sulla germinazione: l'epoca di raccolta, il tempo trascorso tra raccolta e inizio della conservazione, il contenuto in umidità del seme e la temperatura di conservazione. La deidratazione è un fattore molto importante ai fini della conservazione: i semi possono essere conservati con successo per parecchi anni a basse temperature ma solo se il contenuto idrico è preventivamente ridotto intorno a valori del 5-8%. Il livello di idratazione può essere determinato in modo rapido disidratando con una termobilancia a raggi infrarossi quantitativi di seme di circa 200 mg. Nel caso di semi prodotti da *P. nigra* talvolta la deidratazione avviene naturalmente senza alcuna necessità di trattamento. Il contenuto di umidità deve essere ridotto in modo graduale; un metodo valido per raggiungere i valori ottimali di idratazione consiste nel lasciare i semi in corrente d'aria per un periodo di 2-5 giorni a +20 C° o, meglio, nel mettere il materiale in stufa ad una temperatura di 35 C° per un periodo di circa 10-30 minuti, a seconda del contenuto iniziale di acqua. Per quanto riguarda la conservazione il materiale può essere preventivamente posto in piccoli contenitori come provette o, meglio, confezionato in bustine sigillate sotto vuoto. La temperatura di conservazione è un fattore molto importante: a +4 C° non è possibile preservare la capacità germinativa neppure per periodi inferiori a un anno. Nel caso di lotti di seme di *P. deltoides*, *P. nigra* e *P. xcanadensis*, i migliori risultati sono stati ottenuti con temperature comprese tra -18 C° e -40 C° (Cagelli, 1997). Dal momento che in questo intervallo di temperature non sono mai state rilevate differenze significative di germinabilità, la temperatura di -18 C°, facilmente raggiungibile in un normale freezer, può essere considerata ottimale per preservare la vitalità di lotti di seme nel lungo periodo. In queste condizioni alcuni lotti di seme delle specie sopra citate hanno mantenuto una buona facoltà germinativa (40-50%) per un periodo di 10 anni. Prima del riutilizzo dopo un lungo periodo di conservazione è opportuno che, sia il passaggio da temperature molto basse a quelle attorno a valori di +20 C°, sia la reidratazione, avvengano gradualmente, soprattutto per evitare che una imbibizione troppo rapida possa provocare danni irreversibili.

10.3.4 Raccolta e conservazione polline

Come per i semi, anche la vitalità del polline è condizionata da diversi fattori: il lasso di tempo e la metodologia di raccolta, il periodo trascorso tra la raccolta e l'inizio dello stoccaggio, il contenuto di umidità e la temperatura di conservazione.

Mentre la qualità del seme può essere facilmente verificata mediante test di germinazione, il saggio della vitalità del polline nelle *Salicaceae* è più difficoltoso. Non si dispone ancora di sufficienti infor-

mazioni sulla correlazione tra vitalità del polline e capacità di fecondazione. Quest'ultima caratteristica si valuta attraverso la quantità di seme prodotto da parte del soggetto femminile fecondato: secondo dati forniti da prove sperimentali preliminari sembra che, anche impiegando lotti di polline caratterizzati da scarsa vitalità, sia possibile ottenere in genere buone produzioni di seme in termini quantitativi.

I rami fiorali maschili possono essere raccolti nel corso di tutto il periodo invernale; la quantità maggiore di polline si ottiene però da rami prelevati in prossimità della germogliazione delle piante, che possono essere conservati in vasi con acqua (fig. 48), e mantenuti in ambiente controllato (serra) ad una temperatura di circa +20 C° e umidità relativa del 70%.

La raccolta del polline può essere effettuata in due modi: direttamente dalle antere, al momento della deiscenza naturale, oppure da amenti raccolti a fine sviluppo lasciati per 24 ore su setacci, ad una temperatura di circa +25 C° e umidità relativa attorno a valori del 40%. La germinabilità è elevata subito dopo la raccolta, ma può decrescere rapidamente fino ad annullarsi dopo un periodo di conservazione di una settimana a +4 C° in gel di silice. Uno dei test più utilizzati per valutare la facoltà germinativa *in vitro* è quello proposto da Brewbacker *et* Kwack (1963). Consiste nel preparare un substrato agarizzato (KNO_3 0,1 g/l; CaNO_3 0,3 g/l; H_3BO_3 0,1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; saccarosio 100 g/l per *P. deltoides*, 200 g/l per *P. nigra*), su cui si pongono i granuli di polline a germinare. La germinazione (fig. 49) è valutata a distanza di 12 e 24 ore dall'inoculo misurando la lunghezza del tubetto pollinico. Altro metodo rapido è il test del tetrazolio (Fig. 47) che consente di valutare la vitalità del polline in base all'intensità di colorazione assunta dai granuli pollinici. Quelli che reagiscono positivamente a questo test assumono una colorazione che va dal rosa chiaro al rosa intenso, la reazione colorimetrica inizia dopo circa trenta minuti e raggiunge il massimo entro un'ora (Rajora *et* Zuffa, 1986).

Il contenuto di umidità dei granuli di polline varia notevolmente tra specie e specie e tra i vari genotipi della stessa specie, in un intervallo di valori tra il 10% e l'80%. Anche nel caso del polline, per



Figura 47- Test colorimetrico al TTC in polline di *Populus nigra*. (foto: L. Cagelli)



Figura 48 – Raccolta del polline. (foto: L. Cagelli)



Figura 49 – Polline di *Populus nigra* in germinazione. (foto: L. Cagelli)

quanto riguarda la conservazione nel tempo, il contenuto idrico sembra essere il fattore fondamentale. Prima di porre il materiale in conservazione è necessario ridurne il contenuto idrico a valori inferiori al 10%. Un periodo di 2 ore su gel di silice a + 4 C° consente in genere di abbassare l'umidità attorno a valori del 7-10%, sia nel caso di polline di *P. nigra* sia di *P. deltoides*. Tuttavia, un periodo di disidratazione di circa 12 ore a + 4°C è la tecnica più comunemente usata e sicura per la gestione di partite di polline caratterizzate da contenuti di umidità molto variabili. Anche in questo caso il contenuto idrico può essere valutato disidratando campioni di circa 120 mg di polline usando una termobilancia a raggi infrarossi (metodo distruttivo). Dopo la disidratazione, il polline può essere conservato efficacemente a temperature comprese tra -18 C° e - 40 C° per un periodo di almeno un anno. Ulteriori studi saranno necessari per definire contenuti idrici e temperature ottimali per la conservazione del polline per periodi di tempo più prolungati. Al momento, sulla base di test condotti nel corso di incroci artificiali, lotti di polline conservati per un periodo di 5 anni in freezer a -40 C° sono stati utilizzati con successo sia per quanto riguarda la capacità fecondante sia per il numero e la qualità dei semi prodotti. Unica importante precauzione da seguire è quella di effettuare gradualmente la reidratazione del materiale prima dell'uso. Per il polline conservato per periodi brevi è sufficiente un'esposizione a elevata umidità (60-70%) per 1-2 ore a circa + 20 C° di temperatura; dopo una lunga conservazione è importante assicurare un passaggio graduale di temperatura, idratando dapprima il materiale per un periodo di 1 ora a +4 C° e poi per 2 ore a +20 C° (Stanton *et Villar*, 1996).

10.4 Un esempio di studio demografico: il progetto AFA in Spagna

Per quanto riguarda lo studio demografico delle popolazioni e per lo studio della dinamica di popolazione, viene presentata come esempio la metodologia adottata nel progetto AFA (*Atlas Flora Amenazada*), presentata recentemente in Spagna (Albert *et al.*, 2003).

Il progetto è stato promosso e finanziato dal Ministero dell'Ambiente spagnolo, vede il coinvolgimento di oltre un centinaio di esperti e nasce con l'obiettivo principale di analizzare lo stato di conservazione della flora della Spagna per agevolarne la gestione in un'ottica di conservazione. Nel primo anno del progetto (2000) si è operato per aggiornare e unificare i dati relativi alla flora sulla base delle categorie stabilite dal *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN), arrivando alla pubblicazione del Libro rosso della flora spagnola minacciata (Bañares *et al.*, 2003). Nel biennio 2001-2002 è stata realizzata l'analisi di campo sulle specie finalizzata ad uniformare il lavoro di tutte le unità operative, così pure la definizione della metodologia di raccolta dati nelle analisi demografiche. Tutto ciò ha consentito l'elaborazione di un manuale metodologico.

In particolare per lo studio della dinamica di popolazione si è tenuto conto della necessità di avere, per molti anni successivi, dati relativi alla dimensione degli individui, alla produzione di semi, al numero di plantule che germinano e al numero di quelle che sopravvivono. Ciò ha comportato un monitoraggio di ogni esemplare per lungo tempo, considerando un numero di esemplari rappresentativo dell'intera popolazione. Uno studio di questo tipo si può applicare, seppure con alcune difficoltà, a piante perenni (ad esempio, geofite che presentano una stasi vegetativa) ma non a specie annuali per le quali diventa necessario analizzare la banca di semi del suolo. Nel caso di popolazioni con un numero di individui limitato, come nel caso di alcune endemiche puntiformi, è importante effettuare dei monitoraggi sull'intera popolazione, censendo tutti gli individui presenti. Qualora invece si realizzino studi su popolazioni estese e con ampia distribuzione, diventa indispensabile individuare

delle aree di saggio (quadrati permanenti), di dimensioni variabili a seconda del *taxon* indagato, rappresentative della popolazione e di tutti gli habitat in cui tale specie si trova. Il numero, la localizzazione e le dimensioni dei quadrati permanenti sono correlati alle dimensioni della popolazione e al range ecologico di distribuzione della specie. Per esempio:

- Popolazioni ridotte (meno di 3000 esemplari) e omogenee: si delimita una parcella che includa almeno il 10% degli individui e questi si analizzano tutti, indipendentemente dalle dimensioni o dallo stadio di sviluppo. Qualora siano evidenti diversi microhabitat è preferibile selezionare parcelle significative, dopo aver discriminato ognuno di essi.
- Popolazioni grandi e omogenee: si individuano 2 parcelle *random*, ognuna con almeno il 5% degli individui totali della popolazione e aventi al massimo 300 individui. Se la popolazione non è omogenea si dovranno selezionare 2-4 parcelle, posizionate nei diversi microhabitat selezionati.

La forma della parcella sarà preferibilmente quadrata o rettangolare, se la topografia del sito lo consente. I 4 vertici verranno indicati con picchetti, mentre per i lati si useranno corde o aste metriche. Qualora la forma non sia quella ottimale, è importante fare un disegno estremamente dettagliato della forma della parcella e riportare le misure per poter calcolare l'area totale e quindi la densità delle piante; se necessario si possono individuare all'interno dell'area di saggio tante subparcelle in modo da includere i 300 individui. In situazioni particolari (pareti o affioramenti rocciosi), si può utilizzare la vernice per delimitare le aree. È fondamentale redigere per ogni parcella una monografia del sito, con delle foto, dei riferimenti metrici e le indicazioni per poterlo raggiungere, in modo tale che chiunque possa arrivarci in qualunque momento.

10.4.1 Studio degli individui

Al fine di seguire negli anni la crescita, la sopravvivenza e la rigenerazione delle popolazioni è necessario identificare tutti gli individui presenti dentro la parcella, oltre a quelli che compariranno nel tempo, attribuendo a ognuno un codice alfanumerico identificativo.

È fondamentale realizzare questo censimento durante il periodo di fioritura-fruttificazione per poter individuare tutti gli esemplari di una popolazione, soprattutto quando questi sono di dimensioni ridotte e di conseguenza potrebbero passare inosservati; in questo modo inoltre sarà possibile raccogliere contemporaneamente i dati relativi all'accrescimento, alla sopravvivenza e alla biologia riproduttiva degli individui. Tale censimento va ripetuto tutti gli anni, in date molto simili (con scostamenti massimi di un mese da anno ad anno) per ottenere dati omogenei e comparabili.

Per le piante annuali non serve marcare gli individui, salvo il caso in cui si voglia fare uno studio della fenologia della fioritura e/o fruttificazione.

Per le altre specie il metodo di identificazione degli individui dipende dalle dimensioni degli individui adulti, dalla forma biologica e dalla tipologia dell'habitat.

I singoli individui di una parcella possono essere individuati in vari modi, per esempio attraverso:

- paletti in legno o in ferro zincato (circa 7 cm di lunghezza) conficcati vicino ad ogni individuo, con all'estremità un anello metallico recante impresso il codice identificativo;
- etichette metalliche o in plastica legate al tronco o ai rami dell'individuo;
- bandierine poste a lato degli individui indicanti il codice.

Per segnalare l'ubicazione degli individui, dopo aver delimitato la parcella, si può procedere nei seguenti modi:

1. Mappatura attraverso un plastico. Delimitata la parcella, si ricopre con lamine di plastica e contemporaneamente si disegna il contorno degli individui sottostanti oppure si indica con un punto

la loro posizione; le lamine devono avere un certo spessore (circa 0,5 mm), essere trasparenti e maneggevoli (1 m²); ogni lamina riporterà un codice che ne identifica la posizione rispetto all'intera parcella (sistema riga-colonna) in modo tale da poterle riposizionare esattamente nello stesso punto nei monitoraggi successivi. Nel caso in cui un individuo si trovi al limite tra diverse lamine, si disegnerà in ogni lamina solo la parte corrispondente dell'individuo, il quale potrà essere misurato unendo i diversi fogli interessati. Utilizzando tale metodologia non è necessario etichettare gli individui.

2. Mappatura attraverso quadrati. Si suddivide la parcella in tanti quadrati servendosi di corde legate a dei picchetti conficcati al suolo; ogni individuo si identificherà dal numero del quadrato (sistema riga-colonna) e, all'interno, sulla base delle coordinate.
3. Mappatura attraverso strutture metalliche. Metodo molto utile nel caso di individui di piccole dimensioni che si ritrovano molto ravvicinati tra loro;
4. Mappatura attraverso GPS dotato di un sistema per la correzione differenziale istantanea. Ogni individuo viene identificato grazie alle coordinate; il sistema è molto utile nel caso di alberi o arbusti di grande portamento.

In aree pascolative è possibile che si modifichi la parcella a causa della presenza degli animali; per tale motivo si raccomanda di utilizzare una doppia identificazione delle piante per consentire una loro localizzazione negli anni successivi. In tali situazioni è consigliabile verniciare la sommità dei picchetti identificativi dei vertici della parcella e interrarli completamente; la loro posizione verrà identificata misurando con rotella metrica e bussola le distanze e i relativi orientamenti rispetto a tre punti fissi opportunamente identificati (es.: rocce, etc.)

10.4.2 Dati da raccogliere in ogni parcella

Dimensioni degli individui: non esiste una metodologia unica, vista la grande variabilità specifica. In ogni caso si possono individuare alcune soluzioni di carattere generale, che ovviamente dovranno essere valutate di volta in volta durante il lavoro di rilevamento in campo.

In generale per le camefite basse o per le piante aventi rosetta basale, può essere interessante misurare la dimensione maggiore e la dimensione perpendicolare a questa.

Nel caso delle camefite ascendenti e delle nanofanerofite, la misura più efficace è data dall'altezza totale e il diametro del tronco a contatto con il suolo. Per le fanerofite il parametro più semplice da misurare è il diametro del tronco all'altezza del petto (o DBH) e se possibile l'altezza massima.

Un altro metodo semplice per stimare la dimensione delle piante consiste nel contare il numero delle foglie e/o rilevare la loro lunghezza e/o larghezza.

Nel caso di piante annuali non è necessario misurare le dimensioni visto che saranno coetanee rispetto a un'analisi di periodicità annuale.

Per quanto concerne gli stadi vitali si individuano essenzialmente 3 stadi:

- plantule: individui nati durante la stagione in corso, identificabili perché provvisti di cotiledoni;
- giovani o individui vegetativi: individui sprovvisti di cotiledoni e senza strutture riproduttive;
- adulti o riproduttori: individui con strutture riproduttive.

Per quelle specie delle quali non si conosce la fisionomia delle plantule, questo dato non potrà essere raccolto il primo anno. Per poterle identificare l'anno successivo sarà necessario raccogliere un campione di semi al termine della stagione di fruttificazione e seminarli in condizioni controllate in laboratorio. Negli anni successivi dopo aver identificato le plantule, queste verranno identificate nello stesso modo che il resto degli individui o, se questo non è possibile, in un altro modo che consenta comunque il monitoraggio negli anni seguenti. A ciascuna plantula che si sviluppa ogni anno bisognerà attribuire un codice alfanumerico di identificazione.

10.4.3 Produzione di frutti per pianta

Per ottenere questo dato è necessario contare o stimare il numero totale dei frutti per ogni individuo della parcella e stimare il numero medio di semi per frutto. La fruttificazione varia molto in funzione della specie ma anche in virtù delle condizioni ambientali. Qualora non si disponga di dati da bibliografia, il primo anno è necessario monitorare almeno 3 volte la popolazione durante il periodo di fioritura e fruttificazione.

E' importante verificare che le strutture riproduttive rimangano sulla pianta fino a maturazione o che resti una parte o una cicatrice che consenta di contarle in un secondo momento, se la fioritura-fruttificazione è simultanea o scaglionata nell'individuo e nella popolazione. Tutti questi dati serviranno per stimare la produzione totale di frutti e quindi di semi, nel caso in cui non possano essere contati direttamente dalla pianta.

In alcuni casi sarà possibile contare direttamente il numero totale di frutti che ha prodotto ogni singola pianta della parcella. Quando non è possibile effettuare una conta diretta, si possono avere due casi:

1. Specie con fiori ermafroditi e specie monoiche: se il numero di strutture fiorali per pianta (boccioli, fiori e/o frutti, secondo lo stadio fenologico) è superiore a 100, si può procedere ad una stima nei modi seguenti:
 - per le specie con produzione omogenea in tutto l'individuo, si possono contare i frutti presenti nella metà della pianta e moltiplicare il dato per 2 o contando un terzo e moltiplicando per 3;
 - se la produzione è eterogenea, cioè con quantità variabili nelle diverse parti della pianta, il dato si può ottenere moltiplicando il numero totale di infiorescenze per il numero medio di frutti per infiorescenza.
2. Specie dioiche: bisogna specificare il sesso della pianta e solo per quelle di sesso femminile si seguirà il processo elencato nel punto 1.

10.4.4 Altri dati

Nel caso siano evidenti i segnali di erbivoria, parassitismo, predazione e forme di fitofagia varie, bisogna annotare il tipo di danno (v. 13.5) e quantificarlo come percentuale rispetto all'intera pianta oppure attraverso una scala numerica da 0 (nessuna parte della pianta interessata) a 4 (>75% della pianta interessata del fenomeno).

10.4.5 Altri studi da condurre

- Numero medio di semi per frutto: raccogliere, fuori dalla parcella, 1-2 frutti da almeno 30 individui diversi e, in laboratorio, contare i semi per frutto (v. 13.8 e 13.9).
- Stima del tasso di riproduzione vegetativa: nelle specie che si riproducono in modo asessuale, identificare gli individui che nascono per via vegetativa e il codice alfanumerico della pianta più vicina. E' necessario inoltre conoscere il tipo di moltiplicazione vegetativa; questo si può dedurre estirpando alcuni esemplari fuori dalla parcella e verificando come sono uniti tra loro. Questo studio si può implementare con piante coltivate in serra o attraverso altro materiale proveniente da collezioni *ex situ*.

- Banca dei semi del suolo: per lo studio della dinamica di popolazione delle specie annuali bisogna conoscere la banca di semi del suolo germinabili; allo scopo è necessario prendere, fuori dalla parcella, almeno 50 campioni dei primi 3 cm di suolo (su aree di almeno 200 cm²) e, in laboratorio, mettere a germinare i semi; si conteranno le plantule nate durante un periodo non inferiore a 2 mesi. Se i semi sono facilmente individuabili si possono contare direttamente, evitando le prove di germinazione in laboratorio (v. 13.11).

10.5 Analisi d'immagine: uno strumento utile per la caratterizzazione dei parametri morfometrici e colorimetrici delle accessioni

Il germoplasma può essere caratterizzato attraverso parametri qualitativi quali la forma, le dimensioni e il colore. Tali parametri sono di difficile misurazione, infatti di alcuni è possibile solo una stima e non una misura esatta ed oggettiva.

Le caratteristiche dimensionali sono di norma stimate manualmente, con elevato dispendio di tempo. Il colore è attualmente valutato con una stima ad occhio per confronto con colori standard in apposite tabelle fotografiche di riferimento, dalle quali è possibile risalire al valore RGB (Rosso, Giallo, Blu) o HLS (Tonalità, Luminosità, Saturazione) corrispondente (Fagundez *et Izco*, 2003). Tale metodo è soggettivo e non ripetibile, infatti due operatori possono attribuire colori diversi allo stesso campione e lo stesso operatore può assegnare colori diversi in tempi successivi. Inoltre, spesso non si riesce a stimare piccole differenze tra singoli semi all'interno di un campione. Anche la forma è stimata visivamente, e non è possibile ottenere valori oggettivi.

I limiti sopra esposti riguardo lo studio morfo-colorimetrico dei semi, possono essere ampiamente superati con misure reali e oggettive sia dei parametri dimensionali sia di quelli relativi alla forma e al colore. Sono infatti oggi disponibili nuovi metodi, non distruttivi e veloci, basati sulla tecnologia dell'analisi d'immagine (Venora *et Grillo* 2006; Venora *et al.*, 2006).

Qui di seguito viene riportato un esempio di applicazione della tecnologia di analisi d'immagine per la caratterizzazione morfo-colorimetrica dei semi e successiva classificazione statistica. La validità di questa applicazione è stata accertata su diverse accessioni di fagiolo (Venora *et Grillo*, *op. cit.*) e lenticchie coltivate (Venora *et al.*, *op. cit.*).

Le immagini dei semi che si vogliono analizzare sono acquisite per mezzo di uno scanner piano adeguatamente standardizzato (fig. 50 e 51), successivamente o congiuntamente, le immagini sono elaborate mediante una Macro (fig. 52-58) appositamente sviluppata in linguaggio KS400 (Sistema di Analisi d'Immagine - Zeiss), con la quale è possibile misurare i seguenti parametri:

- area;
- perimetro;
- diametro massimo;
- diametro minimo;
- fattore di forma;
- fattore di rotondità;
- rapporto tra diametri.

Il fattore di forma viene calcolato sulla base della seguente formula:

$$F.forma = \frac{4 \cdot \pi \cdot Area}{Perimetro^2}$$

Questo fattore assume valori compresi tra 0 e 1, dove 1 è indice di perfetta omogeneità di forma. Il fattore di rotondità è il valore dato dalla seguente formula:

$$F. \text{ rotondità} = \frac{4 \cdot \text{Area}}{\pi \cdot \text{Diametro max}^2}$$

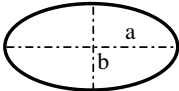
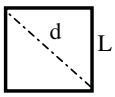
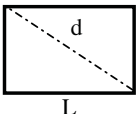
Questo fattore assume valori che vanno da 0 a 1, dove 1 è indice di perfetta circolarità. Il rapporto tra diametri (m/M) è il valore del rapporto d'aspetto, cioè il rapporto tra il diametro minore e maggiore secondo la seguente formula:

$$F. \text{ ratio} = \frac{\text{Diametro min}}{\text{Diametro max}}$$

Anche in questo caso i valori variano da 0 a 1, dove 1 indica che i due diametri sono identici.

In tab. 6 sono riportati alcuni esempi dei valori di questi tre fattori relativi a quattro differenti forme geometriche :

Tabella 6 – Parametri morfometrici. (dati: G. Venora)

	Fattore di forma	Fattore di rotondità	Feret Ratio
 $r = x$	1	1	1
 $a = 6$ $b = 4$	0.67	0.67	0.67
 $L = 2$ $d = 2.828$	0.785	0.64	0.71
 $L = 5$ $l = 2$ $d = 5.385$	0.16	0.44	0.37

Per quanto concerne i parametri colorimetrici i valori di R, G, B, e H, L, S (modelli di colore) indicano rispettivamente il valore medio del canale Rosso, Verde, Blu, e Tonalità, Luminosità e Saturazione dell'intero oggetto in esame e sono espressi in scala di grigio con valori che vanno da 0 (nero) a 255 (bianco).

Se i semi presentano ornamenti del tegumento è possibile determinare l'area media delle macchie (ornamenti), numero di macchie per seme e area percentuale delle macchie per seme. L'area delle macchie è un parametro che indica la superficie delle macchie totali di ogni oggetto, espressa in mm². Per quanto riguarda i parametri colorimetrici, in presenza di ornamenti, si distinguono il colore del fondo (colore dominante % >50) e il colore delle macchie.

I dati grezzi vengono inseriti, per singola immagine, in una tabella di un foglio di calcolo e possono essere considerati come caratteristiche intrinseche dei semi, oppure utilizzati per la realizzazione di appositi “classificatori” statistici (Venora *et* Grillo, *op. cit.*; Venora *et al.*, *op. cit.*).

A seguire viene riportata la sequenza di immagini elaborate, che vengono utilizzate per effettuare le misure morfometriche e colorimetriche dei semi. Come esempio è stata utilizzata un'immagine di *Astragalus verrucosus* che presenta semi senza ornamenti.



Figura 50 - Immagine originale. Questa immagine può essere acquisita anche da uno scanner remoto e successivamente elaborata dall'analizzatore d'immagine. (foto: G. Venora)



Figura 51 - Immagine standardizzata. Questa operazione consente di ottenere risultati sovrapponibili per il colore, utilizzando qualsiasi tipo di scanner. (foto: G. Venora)

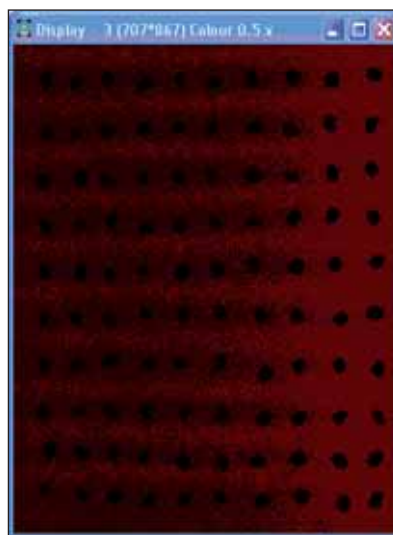


Figura 52 - Immagine contrastata. Serve a delineare con chiarezza il contorno degli oggetti che dovranno essere misurati. (foto: G. Venora)

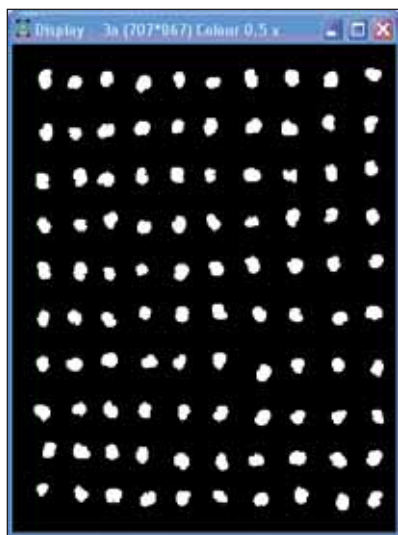


Figura 53 - Immagine segmentata. E' il risultato della separazione degli oggetti da misurare dallo sfondo e rappresenta l'immagine che servirà da impronta per permettere al sistema di distinguere quali sono gli oggetti di interesse. (foto: G. Venora)



Figura 54 - Immagine in HLS. Creata dall'immagine standardizzata per convertire i colori dal modello RGB (Red, Green, Blue) al modello HLS (Hue, Lightness, Saturation) in modo da ottenere un'immagine sulla quale è possibile misurare altri tre parametri colorimetrici. (foto: G. Venora)

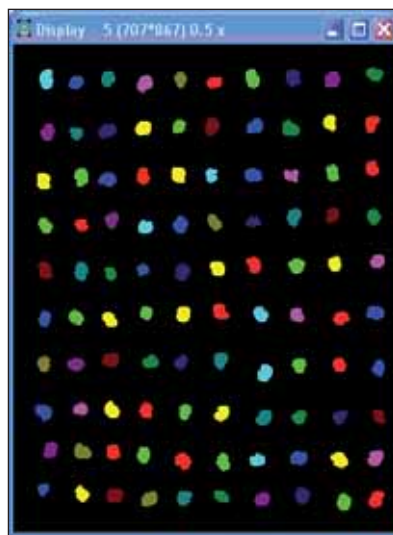


Figura 55 - Immagine con oggetti identificati. Questa immagine ha il semplice scopo di appurare visivamente che tutti gli oggetti da analizzare siano separati e che due o più oggetti non vengano considerati dal sistema come un unico seme (oggetto). (foto: G. Venora)

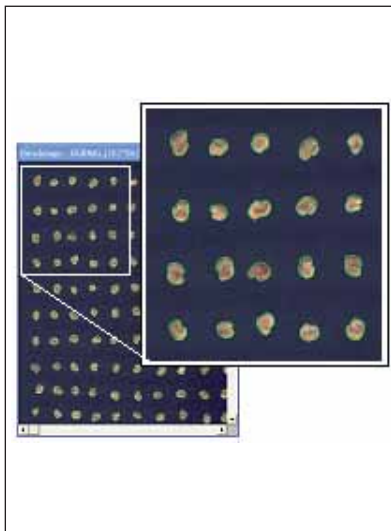


Figura 56 - Immagine per la misura dei parametri morfometrici. Permette la selezione interattiva degli oggetti sui quali effettuare le misure relative a forma e dimensione.
(foto: G. Venora)

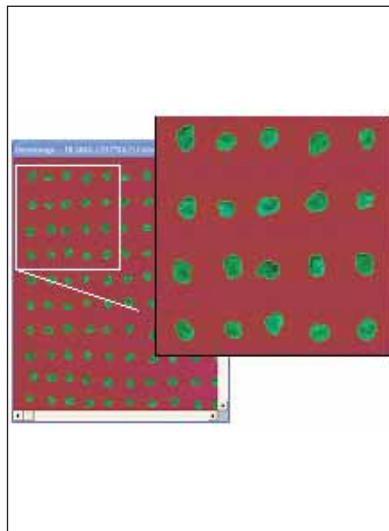


Figura 57 - Immagine di misura. Permette di selezionare interattivamente gli oggetti sui quali effettuare le misure colorimetriche. (foto: G. Venora)

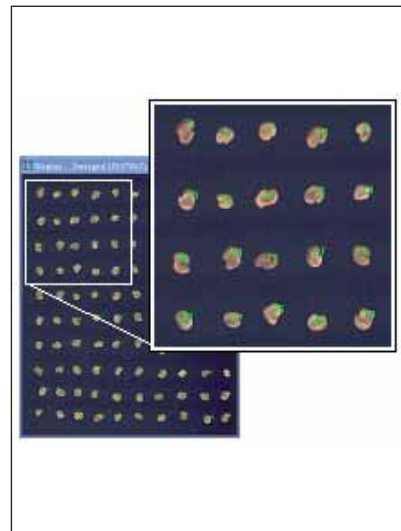


Figura 58 - Immagine numerata. Questa è l'immagine che viene salvata alla fine dell'analisi, con impressi i numeri che indicano l'ordine che è stato seguito dal sistema nella misurazione dei singoli oggetti. Ciò consente la correlazione di altre caratteristiche del seme (germinabilità - vitalità) con quelli misurati con l'analisi d'immagine. (foto: G. Venora)

10.6 Dispersione delle diaspore: influenza del vettore e della forma

Sulla base della struttura esterna dei semi o dei frutti Werker (1997) ha individuato diverse strategie di dispersione attive e/o passive di seguito specificate.

10.6.1 Anemocoria

Diaspora determinata dal vento e caratteristica di semi leggeri e spesso dotati di appendici che ne aumentano la superficie. Tipica di numerose famiglie ed in particolare delle *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Poaceae* e *Scrophulariaceae*.

Le appendici possono essere di varia natura:

- peli ricoprenti totalmente o in parte la superficie del seme (es.: *Platanus*, *Nerium oleander*, etc.);
- peli semplici o piumosi formanti un ciuffo o una corona di peli, chiamato pappo (es.: *Taraxacum*, *Crepis*, *Sonchus*, *Hieracium*)
- coda piumosa (es.: *Clematis*, *Anemone*, etc.);
- ali (es.: *Bignonia*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Acer*, etc.).

10.6.2 Idrocoria

Molti semi e frutti di specie acquatiche fluttuano sull'acqua e sono trascinati dalla corrente (es.: *Posidonia oceanica*, *Nuphar*, etc.), altri appartenenti a specie non acquatiche (es.: *Anchusa formosa*, *Pancratium maritimum*) possono essere trasportati dalle acque meteoriche, da quelle dei corsi d'acqua o dalle maree e disperdersi anche a distanze considerevoli.

10.6.3 Autocoria

L'autocoria è una tipologia di dispersione nella quale la diaspora è assicurata dalla pianta stessa. Il metodo passivo di dispersione attraverso il quale i frutti o i semi cadono in prossimità della pianta madre e per gravità possono essere trascinati verso il basso viene chiamato barocoria. I semi così dispersi possono, in un secondo tempo, essere mangiati da animali che ne assicurano in questo modo la dispersione (diplocoria). Le specie geocore non disperdono i loro semi, ma interrano i loro frutti, assicurando in tal modo la loro conservazione sul posto (es.: *Morisia monanthos* (Viv.) Ascherson, *Arachis hypogaea* L., *Trifolium subterraneum* L.). La maturazione di alcuni frutti secchi si accompagna ad un vero e proprio lancio (balistocoria) dei loro semi (es.: *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Acanthus mollis* L., *Cardamine*, *Geranium*, etc.). In *Hura crepitans* L. il frutto esplode in 18 pezzi con una tale violenza che i semi, di 1 cm di spessore, vengono proiettati fino a 25 m. In *Mercurialis annua* L. i semi vengono lanciati anche ad una distanza media di 15 cm (Lisci *et* Pacini, 1997). Il raggio di disseminazione dei semi attraverso questo meccanismo è molto più limitato rispetto a quello assicurato dalla dispersione attraverso il vento, l'acqua o gli animali.

10.6.4 Zoocoria

La zoocoria è la disseminazione ad opera degli animali in cui l'animale gioca un ruolo attivo (principalmente attraverso l'endozoocoria) o un ruolo passivo (epizoocoria).

Nel caso dell'endozoocoria, i semi sono sempre contenuti all'interno di frutti o pseudofrutti carnosì, consumati dall'animale frugivoro (es.: *Ficus carica* L., *Fragaria vesca* L., *Pyrus*, *Malus*, *Phoenix*, etc.) e, espulsi con le feci, germinano facilmente, in quanto i loro tegumenti sono stati aggrediti dagli acidi gastrici nel corso del transito nell'apparato digerente dell'animale.

L'epizoocoria si attua per tutti quei semi secchi muniti di un sistema di ancoraggio macro o microscopico, mediante setole, peli e uncini che consentono il fissaggio ai peli o alle piume dell'animale (es.: *Xanthium strumarium* L., *Agrostemma githago* L., etc.). Inoltre, più semplicemente, gli animali trasportano dei semi anche attraverso la terra attaccata alle loro zampe.

Le formiche meritano un discorso a parte, non attuando né endozoocoria né epizoocoria propriamente dette. E' assodato che questi imenotteri trasportano, tra le loro mandibole, un grande numero di semi, in particolare quelli provvisti di appendici ricche in olii dei quali si cibano (es.: *Euphorbia*). Tale tipo di dispersione delle diaspore viene detta mirmecocoria.

10.6.5 Elaiosomi e dispersione dei semi nelle piante mediterranee

Dispersione

Nei semi di alcuni frutti secchi si trova un'appendice del seme, non coinvolta nella germinazione, la cui funzione principale è quella di attirare gli animali disperditori, comunemente formiche, più raramente uccelli (Lisci *et al.*, 1996). Questa appendice è stata chiamata "elaiosoma" da Sernander (1906) perché contiene lipidi, ma anche caruncola, strofiolo, etc. Tuttavia, indipendentemente dal nome e dalla sua origine anatomica, la sua funzione è principalmente quella ecologica di facilitare la dispersione del seme mediante le formiche che trovano nell'elaiosoma una ricompensa commestibile (Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Gli elaiosomi sono come dei cappucci che si trovano ad una estremità del seme, sempre di colore chiaro che contrasta con il resto del seme che è solitamente scuro, marrone o nero. Sono costituiti da

cellule morte il cui citoplasma è trasformato in riserve lipidiche. Gli elaiosomi sono teneri e facilmente rimovibili, sia dalle formiche sia sperimentalmente dall'uomo.

Le riserve degli elaiosomi consistono comunemente in lipidi, solo in alcuni casi particolari contengono anche delle proteine, come nel caso di *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cytisus scoparius*, *Euphorbia cyparissias* L., *Centaurea parlatoris* Heldr.; oppure dell'amido come in *Euphorbia lathyris* L., *Lamium purpureum* L. e *Tussilago farfara* L. In *Centaurea jacea* L. le ricompense per i disperditori consistono solo in proteine tanto che non sarebbe neanche il caso di chiamare queste strutture elaiosomi (Lisci *et al.*, *op. cit.*; Viegi *et al.*, 2003).

Quando è stato misurato il contenuto calorico dell'intero seme e dell'elaiosoma è stato notato che quest'ultimo contiene sempre circa un terzo dell'energia del seme, indipendentemente dal gruppo sistematico (Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Tra i frutti secchi con elaiosomi dell'ambiente mediterraneo sono da ricordare quelli delle specie dei generi *Euphorbia*, *Viola*, *Chelidonium*, *Corydalis*, *Melampyrum*, *Trillium*, *Vulpia* (Beattie *et* Lyons, 1975; Aronne *et* Wilcock, 1994; Lisci *et al.*, *op. cit.*). Elaiosomi si trovano anche negli acheni di *Asteraceae* quali *Sylibum marianum* (L.) Gaertn., in alcune specie del genere *Centaurea* e anche nei semi all'interno di frutti carnosì (es.: *Rhamnus alaternus* L.).

Gli elaiosomi possono essere una costante per un determinato gruppo sistematico, come per esempio le *Euphorbiaceae*, oppure essere presenti sporadicamente all'interno di un genere con un numero elevato di specie come *Centaurea* (Viegi *et al.*, *op. cit.*).

Funzioni dell'elaiosoma

Indipendentemente dalla dispersione, che è la funzione primaria, gli elaiosomi possono indirettamente assolvere anche ad una o più delle seguenti funzioni:

- permettono di evitare la predazione da altri animali perché le formiche fanno sparire i semi dal suolo non appena vengono dispersi dalla pianta madre;
- i semi depositati dalle formiche nel nido sono protetti dal fuoco e dalle alte temperature;
- servono ad evitare la competizione intraspecifica perché i semi sono allontanati dalla pianta che li ha prodotti;
- le pareti delle cellule degli elaiosomi possono essere spesse e contenere delle pectine, cioè delle molecole che riescono ad assorbire e trattenere l'acqua che serve durante l'inizio del processo della germinazione (Bianchini *et* Pacini, 1996);
- proprio grazie a queste pareti spesse gli elaiosomi possono essere coinvolti sia nella deidratazione del seme che precede la dispersione, sia nella reidratazione che precede la germinazione (Lisci *et al.*, *op. cit.*; Bianchini *et* Pacini, *op. cit.*);
- determinano la dormienza del seme, come avviene in *Mercurialis annua*, *Euphorbia cyparissias* e *Calendula arvensis* L. dove il seme germina solo quando l'elaiosoma viene naturalmente o sperimentalmente rimosso (Pacini 1990; Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Elaiosomi e diplocoria

I semi con elaiosomi sono spesso anche diplocori, cioè presentano una dispersione che avviene in due tempi. Aronne *et* Wilcock (1994) hanno messo in evidenza che in *Rhamnus alaternus* prima i frutti carnosì sono dispersi dagli uccelli e poi, dopo defecazione, grazie agli elaiosomi che non sono danneggiati durante il tragitto all'interno dell'apparato digerente, dalle formiche.

Pacini (1990) e Lisci *et* Pacini (1997) mostrano che in *Mercurialis annua* i semi sono prima lanciati grazie a un meccanismo a catapulta delle pareti del frutto, a distanze anche di 130 centimetri e poi sono raccolti dalle formiche che li allontanano più comunemente in un raggio di sei metri, raramente oltre (Lisci *et* Pacini, *op. cit.*).

Viegi *et al.* (2003) invece mostrano che nel genere *Centaurea* gli acheni, a seconda delle specie hanno o no gli elaiosomi e i pappi. Quando pappo ed elaiosoma sono presenti, i peli del pappo, a seconda della specie, possono avere differenti lunghezze, permettendo una dispersione a diverse distanze. In ogni modo la dispersione mediante il vento precede sempre quella attraverso le formiche. Nelle specie dove c'è solo l'elaiosoma o il pappo si ha un solo tipo di dispersione. Gli stessi autori hanno notato che la presenza-assenza degli elaiosomi non segue la sistematica del genere, ribadendo che queste strutture hanno più un significato ecologico per la specie piuttosto che sistematico ed evolutivo. Le distanze a cui le formiche possono disperdere i semi dipendono dalla specie; trattandosi di imenotteri sociali esistono differenti tipi e livelli di socialità. Vi sono formiche appartenenti a specie con basso livello di organizzazione che mangiano l'elaiosoma non appena trovano il seme, allontanandolo di poco dal luogo dove è stato raccolto. Ci sono altre formiche, con un superiore livello di socialità, che portano il seme nel nido, in questo caso l'elaiosoma viene rimosso e il seme buttato fuori dal nido nella pila dei rifiuti. Infine c'è il caso di *Messor structor*, una specie mediterranea che vive in ambienti antropizzati e che una volta portati i semi nel nido, rimuove gli elaiosomi, deposita i semi in cellette separate a seconda delle specie. E' stato ipotizzato che questo meccanismo di "conservazione sistematica" serva per consumare l'interno del seme, pieno di riserve, non appena ammorbidito il tegumento duro mediante l'azione di batteri e funghi (Pacini, 1990). La maggior parte dei semi riesce però a sfuggire a questo "sequestro" grazie alle pratiche agricole di zappatura ed aratura.

Concludendo si può dire che i semi con elaiosomi sono tutti ortodossi (Baskin *et* Baskin, 1998), cioè dispersi con un basso contenuto di acqua e con un metabolismo rallentato. Questo perché gli elaiosomi assicurano la dispersione, ma poiché questa può durare un tempo variabile, anche lungo, la presenza degli elaiosomi non è compatibile con i semi recalcitranti che sono di difficile conservabilità.

10.7 Banca dei semi del suolo

Ecologi e biologi ormai concordano sull'importante ruolo che le banche di semi del suolo rivestono nel mantenimento della biodiversità ecologica (a livello di specie) e genetica nelle popolazioni e nelle comunità vegetali (Gross, 1990). Lo studio della banca dei semi del suolo, che mette in evidenza la capacità delle piante di creare depositi di semi vitali sepolti, aiuta a definire meglio l'autoecologia della specie, a stimare la capacità di resilienza delle comunità, ad approfondire lo studio delle dinamiche vegetazionali e a ottenere informazioni di supporto alla programmazione di attività gestionali (Cerabolini *et al.*, 2003).

La formazione di banche dei semi nel suolo è una strategia frequente nelle piante che vegetano in ambienti soggetti a disturbo, sia naturale sia antropico. Contengono generalmente più semi di specie annuali che di perenni, più semi di piante erbacee a foglia larga (annuali e perenni) che di gramin-

cee, molti semi di leguminose, numerosi semi di piante infestanti specializzate nella colonizzazione di siti disturbati (Miller, 2000). Sulla base del periodo di persistenza dei semi nella banca si individuano:

- banche transitorie: i semi rimangono vitali nel terreno per circa un anno;
- banche persistenti (o durature): i semi rimangono vitali per lungo tempo.

Sono queste ultime quelle che maggiormente contribuiscono alla rigenerazione di cenosi vegetali distrutte o degradate (Thompson, 1993).

Molte specie australiane e sudafricane, adattate al fuoco, nonché alcune conifere mediterranee, formano banchi di semi nei frutti legnosi che si aprono dopo gli incendi (frutti serotini).

Le tipologie di piante che formano banche di semi in aree nordamericane normalmente soggette a incendi si illustrano nel seguente schema (tab. 7):

Tabella 7 – Tipologie di banche dei semi del suolo in aree nordamericane soggette a incendi (Miller, 2000).

Gruppi di specie	Banche transitorie	nel terreno	Banche persistenti o durature nella chioma (frutti)	la germinazione è stimolata dal fuoco
Conifere (alberi)	X		X	
Latifoglie sempre verdi (alberi)	X			
Caducifoglie (alberi)	X			
Arbusti	X	X		X
Erbacee a foglia larga di dimensioni medio-grandi (annuali)	X	X		X
Erbacee a foglia larga di dimensioni medio-grandi (perenni)	X	X		X
Graminacee	X			

Il procedimento per lo studio della banca dei semi del suolo consiste dapprima nel prelevare campioni di suolo, nel riporli in sacchetti di plastica e nel registrare le informazioni utili al riconoscimento dei semi presenti. Successivamente, presso la banca del germoplasma, si procede attentamente al riconoscimento dei semi contenuti nel campione. Lo studio può essere condotto estraendo manualmente o con l'ausilio di strumentazioni meccaniche i semi dal terreno, riconoscendoli e conteggiandoli, oppure ponendo i campioni di suolo in ambienti controllati e favorendo la germinazione dei semi in esso contenuti. Il metodo della germinazione prevede che il campione, previamente sistemato in un ambiente controllato, venga distribuito (spessore 1 cm) in vassoi di vetro, dopo aver asportato i resti vegetali (es.: rami, foglie, etc.), i piccoli organismi e i piccoli sassi presenti (Roberts, 1981). Si procede quindi innaffiando il campione e controllando le plantule che via via germinano.

Alternativamente i campioni possono essere messi in camera di germinazione; tale opzione potrebbe non consentire la germinazione di semi dormienti che hanno bisogno di pretrattamenti specifici per germinare. Questa soluzione è quindi utilizzabile solo nel caso in cui sia ben noto il protocollo di germinazione della unità tassonomica indagata.

La difficoltà di applicazione di alcune metodologie ha portato alla definizione di un metodo più rapido e speditivo che consente di predire la persistenza dei semi nel suolo tramite informazioni morfometriche del seme indagato, in questo caso contano principalmente la forma e le dimensioni (Thompson *et al.*, 1993). Il metodo si fonda sull'osservazione che i semi persistenti generalmente sono piccoli e di forma tondeggianti, mentre quelli non persistenti sono grossi, appiattiti o allungati. Le dimensioni e la forma sono, infatti, i parametri che influenzano la capacità di seppellimento del seme nel terreno. E' stato dimostrato che i semi sepolti hanno tassi di predazione più bassi ri-

spetto a quelli che rimangono sulla superficie del terreno (Hulme, 1994), e che la predazione viene considerata il fattore principale che determina il tempo di permanenza del seme nel suolo (Hulme, 1998).

Solo di recente si è iniziato a considerare lo studio delle banche dei semi del suolo nelle analisi demografiche delle popolazioni; questo probabilmente perché i dati che emergono dalle banche del suolo (semi vitali e tasso di germinazione) molto spesso sono difficili da confrontare con i dati relativi alle plantule e alle piante adulte.

Le caratteristiche delle banche dei semi del suolo risultano determinanti per la struttura, dinamica e distribuzione spazio-temporale delle cenosi vegetali in generale e di tipo mediterraneo in particolare (Parker *et al.*, 1989; Ortega *et al.*, 1997; Peco *et al.*, 1998). Le variazioni delle dinamiche delle banche si riflettono nella composizione, distribuzione e dominanza delle specie (Parker *et al.*, 1989). Tuttavia, una diretta correlazione tra la vegetazione e la banca dei semi del suolo non è sempre evidenziabile (Thompson, 1986; Leck, 1989; Rice, 1989) anche perché alcune specie si riproducono sia per seme sia agamicamente.

11. GLOSSARIO

Per l'elaborazione delle definizioni presenti nel glossario che segue sono state consultate principalmente le seguenti opere di riferimento: Arrigoni, 1974; Begon *et al.*, 1989; Canullo *et Falińska*, 2003; Cappelletti, 1975; Cervelli, 2005; Font Quer, 1993; Gerola F.G., 1997; Gerola F.M., 1995; Hartmann *et Kester*, 1990; Mabberley, 1997; Mauseth, 1997; Mezzalana *et Piotto*, *op.cit.*; Musmarra, *op. cit.*; Pacini, 1981; Pignatti, 1995; Piotto *et al.*, 2005; Pupillo *et al.*, 2003; Raven *et al.*, 2002; Ray Peter *et al.*, 1985; Strasburger, 1995; Tonzig *et Marrè*, 1971.

Abscissione

Processo di distacco che avviene in particolari porzioni della pianta chiamate zone di abscissione e che provoca la caduta di foglie, fiori e frutti.

Accessione

Ogni ingresso in banca di uno o più lotti di germoplasma relativi ad una singola raccolta, per una unità tassonomica, di una determinata popolazione; viene identificata con un codice univoco alfanumerico attribuito dalla Banca.

Achenio

Frutto secco, indeiscente. Deriva da un ovario supero monocarpellare, contenente un unico seme non saldato al pericarpo (es.: *Ranunculus*). Nelle *Asteraceae*, che hanno l'ovario infero, il frutto è una cipsela.

Affumicazione

Pretrattamento che prevede l'esposizione al fumo o l'impiego di soluzioni acquose di sostanze che si sprigionano durante gli incendi per interrompere la dormienza dei semi di alcuni *taxa* spontanei in aree soggette a incendi (es.: alcune *Ericaceae*).

Afillia

Assenza totale di foglie o perdita precoce delle stesse. La fotosintesi si compie attraverso i fusti giovani ancora verdi. Caratteristica di numerose specie di *Fabaceae* arboree ed arbustive tipiche della vegetazione mediterranea (es.: *Genista* sp. pl.) e della gran parte delle specie presenti nelle aree tropicali desertiche (es.: *Cactaceae*).

Agamico

Tipo di riproduzione asessuale che avviene senza la fusione di gameti. Gli organismi prodotti presentano un corredo genetico identico a quello parentale materno. Vedi Propagazione vegetativa o agamica.

Agamospermie

Processo apomittico mediante il quale si formano semi senza fusione di gameti.

Albume

Tessuto parenchimatico ricco di sostanze di riserva presente nel seme delle *Angiospermae* e derivato dalla cariogamia tra uno dei nuclei spermatici e i nuclei centrali del sacco embrionale. Quando le

sue riserve sono totalmente consumate dall'embrione durante la maturazione del seme, quest'ultimo viene detto "exalbuminato" (es.: *Fabaceae*). Se, al contrario, l'albume è ancora presente una volta terminata la maturazione, e non è utilizzato dall'embrione se non al momento della germinazione, il seme viene definito "albuminato" (es.: *Poaceae*). Sinonimo di endosperma secondario.

Albuminato

Vedi Albume.

Aliena

Specie estranea alla flora autoctona di un territorio.

Alloctono

Taxon facente parte della flora di un territorio, ma non autoctono.

Allogamia

Impollinazione incrociata ad opera di gameti appartenenti a fiori o individui diversi.

Allopatia

E' la capacità di alcune sostanze di esercitare effetti inibenti su alcuni processi biologici tra cui la germinazione dei semi.

Alofite

Piante che vivono in terreni ricchi di sali. Il loro adattamento è da ricercare in particolari processi fisiologici come l'accumulo di sali nei nuclei cellulari, l'aumento della pressione osmotica, l'eliminazione dei sali attraverso particolari strutture epidermiche, etc.

Analisi d'immagine

Processo che consente elettronicamente, attraverso software specifici, di analizzare e misurare un'immagine.

Androceo

Apparato riproduttore maschile del fiore delle *Angiospermae*, costituito da uno o più stami.

Anemocoria

Processo di dispersione di frutti, semi o spore attraverso il vento. E' uno dei meccanismi di disseminazione più diffuso tra i vegetali superiori.

Anfimissia

Riproduzione sessuale per fusione di due gameti.

Angiospermae

Divisione delle Spermatofite che raggruppa piante con ovuli racchiusi in ovario.

Antera

Porzione fertile dello stame portata dal filamento e costituita da due o più logge, all'interno delle quali è contenuto il polline.

Antesi

Fase fenologica che corrisponde alla schiusura del boccio florale.

Aploide

Cellula il cui nucleo presenta un numero dimezzato di cromosomi.

Apocarpico

Gineceo pluricarpellare con carpelli non saldati tra loro.

Apomissi o Apomissia

Sviluppo virginale dell'ovulo, senza intervento del processo gamico.

Area omogenea

Area uniforme dal punto di vista dei fattori stazionali e ambientali, all'interno della quale possono essere effettuati i campionamenti per la raccolta del germoplasma.

Areale

Distribuzione geografica generale di una specie. L'areale di una specie può essere unitario o disgiunto per effetto di fattori biologici intrinseci alla specie, geografici, ecologici e storici.

Arillo

Involucro di varia natura e consistenza, originatosi da strutture non ovulari, che a maturità avvolge completamente o parzialmente il seme di alcune *Gymnospermae* (es.: *Taxus* sp. pl.).

Associazione

Rappresenta l'unità fondamentale della fitosociologia, è un concetto astratto di comunità vegetale che presenta uguali caratteri floristici, statistici, ecologici, dinamici, corologici, singenetici.

Astone

Si intende sia una pianta giovane vigorosa, sia i rami terminali e poco ramificati, dotati di gemma apicale e in grado ricacciare vegetativamente.

Attecchimento

Riferito all'attecchire, mettere radici e crescere. In campo botanico può essere riferito a trapianti, innesti o messe a dimora di plantule.

Attività dell'acqua (aw)

Parametro che misura indirettamente, con valori compresi tra 0 e 1, la percentuale di acqua libera all'interno del seme rispetto a quella complessivamente contenuta in esso; quanto più è alto il valore di aw, tanto maggiore è la quota di acqua che rimane a disposizione per le attività metaboliche.

Autocoria

Disseminazione operata senza l'aiuto di agenti estranei alla pianta. E' sinonimo di autodisseminazione.

Autoctono

Pianta indigena di un determinato territorio; contrario di alloctono.

Autodisseminazione

Vedi Autocoria.

Autoimpollinazione

Processo di fecondazione in cui l'ovario è fecondato dal polline proveniente dal medesimo fiore.

Autotrofo

Organismo capace di sintetizzare sostanze organiche a partire da molecole inorganiche.

Bacca

Frutto indeiscente, totalmente carnoso, senza distinzione tra mesocarpo ed endocarpo. Si origina da un ovario supero.

Balistocoria

E' la disseminazione operata dalla stessa pianta (autodisseminazione) attraverso l'espulsione o il lancio dei semi a distanza.

Banca dei semi del suolo

Persistenza nel suolo di diaspore (semi e spore) che permettono la rigenerazione naturale di specie vegetali quando le condizioni ambientali sono favorevoli. I semi che formano banche sono sempre ortodossi.

Banche dei geni

Strutture destinate alla conservazione *ex situ* di materiale genetico vegetale o animale.

Banche dei semi

Strutture concepite per la conservazione *ex situ* di accessioni vegetali mediante lo stoccaggio dei semi.

Banche del germoplasma

Strutture in cui vengono conservate le diverse tipologie di accessioni vitali, sia di entità vegetali che animali. Tali accessioni possono essere costituite da geni, semi, spore, pollini, tessuti vitali o parti di vegetali quali bulbi, bulbilli, rizomi, rizotuberi, tuberi, talee, etc.

Biloculare

Struttura costituita da due logge.

Biocenosi

Cenosi costituita da specie animali o vegetali caratteristica di un determinato territorio in equilibrio con l'ambiente.

Bioclima

Rappresenta l'unità base nella attuale classificazione bioclimatica della terra. Si tratta di uno spazio biofisico delimitato da determinate tipologie di vegetazione in relazione con i corrispondenti valori climatici. Attualmente si conoscono 27 tipi di bioclimi.

Biodiversità

Il lemma biodiversità o “diversità biologica” è stato introdotto da W.G. Rosen nel 1988 (Frankel *et al.*, 1995), esso comprende l'insieme e la variabilità di tutti gli organismi viventi di ogni origine e natura che si trovano sulla biosfera. Il termine indica quindi la varietà degli elementi di un insieme e per questo motivo, il numero degli elementi e i loro rapporti quantitativi sono di fondamentale importanza (Ferrari, 2001).

Diversi autori tra cui Lovejoy *et al.* (1984), Gomez-Pompa (1987), Primack (1992) e Wilson (1992) hanno iniziato a parlare di biodiversità a partire dalla seconda metà degli anni '80, senza però definirne esattamente il significato. Fu Norse (1993) a dare la prima definizione formale e a distinguere i due concetti di “diversità genetica” e di “diversità ecologica”, successivamente Heywood (1995) differenziò un terzo livello detto della “diversità degli organismi” e considerò la “diversità culturale” come il risultato dell'interazione antropica con i tre livelli precedenti. I tre livelli di diversità vengono considerati in maniera paritetica anche dalla Convenzione Internazionale sulla Diversità Biologica (CBD).

Biologia della conservazione

Scienza che studia le fasi del ciclo biologico degli organismi, in particolare i processi relativi alla riproduzione e allo sviluppo dei giovani organismi, al fine di individuare le fasi più critiche della loro crescita ed elaborare le strategie di conservazione *in situ* ed *ex situ* più appropriate.

Biotopo

Spazio delimitato e omogeneo in cui per effetto di peculiari condizioni abiotiche vivono una o più biocenosi.

Bosco da seme

Popolamento di alberi con caratteristiche fenotipiche mediamente superiori a quelle di altri popolamenti vegetanti in condizioni simili. Impiegato per la raccolta di semi. Può essere semplicemente selezionato od anche controllato. E' un concetto in via di sostituzione perché oggi si privilegia la conoscenza genetica dei popolamenti.

Bottinatore

Insetto che fa raccolta di cibo, nettare, polline (es.: formiche, api operaie).

Brattea

Foglia trasformata e spesso ridotta, idonea a funzioni particolari (es.: funzione di protezione, di riserva, vessillare, etc.).

Bulbilli

Gemme simili nella forma a bulbi, destinate alla moltiplicazione vegetativa (es.: *Allium* sp. pl., *Cardamine bulbifera* (L.) Crantz., *Lilium bulbiferum* L., *Ornithogalum bulbiferum* L. ex Jackson, *Saxifraga bulbifera* L., etc.).

Bulbo

Breve fusto ipogeo circondato da foglie in forma di squame carnose e ispessite (catafilli). A seconda della morfologia dei catafilli il bulbo si distingue in tunicato, se avvolto per intero e in modo concentrico (es.: *Allium cepa*), o squamoso se, invece, questi costituiscono degli elementi distinti, squamiformi ed embricati (es.: *Lilium* sp. pl.).

Caducifolia

Pianta arborea e arbustiva che perde le foglie all'inizio della stagione sfavorevole (fredda o secca).

Camera di crescita

Incubatore utilizzato per studi relativi alla biologia riproduttiva ed in particolare della germinazione, che consente di impostare diversi valori di termoperiodo e fotoperiodo. Talune camere di crescita hanno inoltre la possibilità di gestire l'umidità interna.

Campionamento

Dicesi delle tecniche utilizzate in campo e/o laboratorio per l'individuazione, la raccolta, l'analisi e la determinazione di un campione.

Campione

Sottoinsieme di una popolazione che rappresenta adeguatamente le caratteristiche della popolazione stessa. Es.: un campione di semi, rappresentativo di tutto l'ammontare dei semi di cui si vogliono determinare le caratteristiche.

Capacità germinativa

Percentuale di semi in grado di germinare in condizioni ben definite; corrisponde alla germinazione massima di un lotto chiamata anche facoltà germinativa.

Capsula

Frutto secco deiscente, bi- o pluricarpellare, spesso capace di agevolare la dispersione dei semi a distanza. A seconda del tipo di deiscenza le capsule prendono nomi diversi (es.: poricida, loculicida, setticida, pisside).

Capsula Petri

Recipiente di vetro o plastica piano, munito di coperchio, generalmente usato per la coltura di microbi o per la germinazione (es.: semi, pollini).

Cariologia

Parte della citologia che studia il nucleo delle cellule, in particolare i cromosomi.

Cariosside

Frutto secco indeiscente, costituito da un unico carpello, contenente un unico seme strettamente aderente al pericarpo (es.: *Poaceae*).

Carpello

Foglia trasformata ai fini riproduttivi e portante gli ovuli.

Carta filtro

Carta assorbente da laboratorio che viene utilizzata come filtro monouso, nonché come substrato nella maggior parte delle prove di germinazione.

Caruncola

Piccolo corpo carnoso, di forma e spessore variabile, situato intorno all'ilo di alcuni semi, in particolare nelle *Euphorbiaceae* (es.: *Jatropha*, *Ricinus*), specializzato per la dispersione entomocora.

Catafillo

Foglia metamorfosata, sessile, priva di clorofilla, di consistenza carnosa o pergamenacea che ha funzione protettiva e di riserva (es.: *Allium cepa*).

Categorie di semi

A seconda della capacità dei semi di tollerare la deidratazione (anche a livelli più bassi di quelli normalmente raggiunti in condizioni naturali) e la successiva conservazione si distinguono i semi in ortodossi, intermedi e recalcitranti.

Chilling

Vedi Stratificazione fredda.

Ciclofisi

Rappresenta il complesso processo di maturazione, ontogenetica e fisiologica, degli apici meristematici.

Ciclo vegetativo

Insieme delle fasi di sviluppo di un vegetale, può comprendere o meno un periodo di stasi o dormienza.

Cipsela

Frutto secco indeiscente delle *Asteraceae*, originatosi da un ovario bicarpellare monospermo infero, spesso fornito all'apice di un pappo o di una caruncola.

Cleistogamia

Facoltà di un fiore di autofecondarsi e di produrre dei semi fertili senza schiudersi (es.: *Orchidaceae*).

Climax

Massimo stadio evolutivo della vegetazione di un dato territorio in relazione alle condizioni pedo-climatiche ed agli altri fattori ambientali.

Clone

Gruppo di individui (ramets o plantets) originati da un singolo campione (ortet) e mantenuti in coltivazione mediante propagazione vegetativa (innesto, talea, margotta, stolone, pollone radicale, coltura in vitro di tessuti di qualsiasi tipo). Tutti i campioni di un clone sono esattamente simili e geneticamente identici all'originale. Molti ibridi sono di origine clonale e sono normalmente propaga-

ti per via vegetativa. Per il loro interesse economico i cloni sono solitamente iscritti in registri quali il Registro Nazionale dei Cloni Forestali.

Coerenza

Grado di coesione del substrato pedologico ed in particolare degli orizzonti più superficiali.

Collezione a lungo termine

Parte dei lotti contenuti in una banca destinati alla conservazione a lungo termine mediante crioconservazione, congelazione o liofilizzazione.

Collezione attiva

Parte dei lotti contenuti in una banca destinati all'utilizzazione a breve periodo (es.: scambi attraverso *Index Seminum*) e stoccati a temperature comprese tra 0 e 5°C.

Colorimetria

Misura quantitativa del colore. Settore della fisica che ha come oggetto la determinazione di grandezze relative al colore e la loro misurazione univoca. Si basa sulla possibilità di riuscire a riprodurre, con un'opportuna mescolanza di tre colori assunti come primari (RGB), una qualsiasi sensazione di colore. Le grandezze che caratterizzano il colore sono la cromaticità (tinta e purezza) e la brillantezza.

Commensalismo

Associazione tra due specie che produce benefici per una specie (commensale) mentre la seconda non viene influenzata né positivamente né negativamente.

Competizione

In botanica rappresenta il complesso delle azioni reciproche fra le piante di un dato territorio (es.: sottrazione di luce, acqua, alimenti). In ecologia costituisce la manifestazione di antagonismo tra individui o popolazioni dello stesso livello trofico (può essere intra o interspecifica).

Confettatura

Lavorazione che consiste nel rivestimento del seme con sostanze inerti, talvolta veicoli di pesticidi e collanti idrosolubili fino ad ottenere un prodotto che ha generalmente l'aspetto di una pillola (confetto). Questa si scioglie o si spacca al contatto con l'acqua, liberando il seme.

Congelamento

Stoccaggio a temperature solitamente comprese tra -18 e -25°C.

Conservazione *ex situ*

Insieme delle strategie adottate al fine della conservazione della diversità genetica e degli organismi, attuate al di fuori degli ambiti naturali in cui questi si trovano. La conservazione a lungo periodo del germoplasma, la moltiplicazione e cura dello stesso, sono tecniche di conservazione *ex situ*.

Conservazione *in situ*

Strategie atte a favorire il ripristino o la salvaguardia in natura della diversità genetica, degli organismi e degli ecosistemi. La tutela di un habitat, di più specie o del popolamento di un'unica unità tas-

sonomica, sono tutte forme di conservazione *in situ*. Anche la reintroduzione di una specie o il ripristino di un habitat sono considerate tecniche *in situ*.

Contenuto di umidità interna del seme (o *moisture content*, mc%)

Riferito ai semi, è il peso di acqua contenuta in essi, espressa in percentuale, rispetto al peso fresco del campione.

Convergenza ecologica

È il caso in cui specie animali e vegetali non affini, che occupano la stessa nicchia ecologica in habitat simili, sviluppano forme e comportamenti simili.

Cotiledone

Lobo carnoso o fogliaceo primordiale contenuto nell'embrione che si inserisce sull'asse ipocotile della plantula nel seme. Le piante con fiori (*Angiospermae*) sono divise in due sottoclassi a seconda che il seme porti uno o due cotiledoni. Le *Gymnospermae* hanno due o più cotiledoni. Di norma i cotiledoni hanno funzioni di riserva.

Crioconservazione

Conservazione di un qualunque materiale biologico, realizzata a temperature molto al di sotto del punto di congelamento e solitamente attuata alla temperatura dell'azoto liquido (−196°C) o dei suoi vapori (−150°C).

Criovial

Contentore generalmente di polipropilene adatto alla crioconservazione del materiale biologico in azoto liquido a −196°C.

Crittogame

Termine senza valore tassonomico, che indica le piante a 'nozze nascoste', cioè prive di fiori e che si riproducono mediante spore (es.: *Pteridophyta* e *Briophyta*).

Cultivar

Insieme di piante coltivate che rappresentano una varietà di interesse agronomico e si distinguono per alcuni caratteri comuni (di forma, di funzione organica, chimici) e che, quando vengono riprodotti per via sessuale, conservano le loro caratteristiche distintive. In modo semplificato: varietà di pianta coltivata.

Decidua

Pianta che stagionalmente perde le foglie. Vedi caducifolia.

Deidratazione

Vedi disidratazione.

Deiscente

Frutto che si apre spontaneamente a maturità liberando i suoi semi.

Demografia

Studio di carattere prevalentemente statistico dei fenomeni riguardanti la popolazione nel suo aspetto statico e dinamico.

Densità di popolazione

Numero di individui per unità di superficie.

Dessiccanti artificiali

Prodotti in grado di adsorbire l'acqua disponibile in un ambiente e/o contenitore come ad esempio il gel di silice.

Diaspora

Unità biologico-funzionale di dispersione capace di generare un nuovo individuo (propaguli, bulbilli, spore, frutti, semi, etc.).

Dicline

Fiore caratterizzato dalla sola presenza dell'androceo o del gineceo, pertanto unisessuale.

Dicotiledoni

Termine generico per indicare qualunque membro della classe delle *Magnoliopsida* che fa parte del *phylum* delle *Magnoliophyta*. Si tratta di unità tassonomiche caratterizzate da un embrione con due cotiledoni, da foglie a lamina ampia con nervature reticolate, elementi fiorali in verticilli di 4-5, fasci conduttori del fusto disposti in cerchio, *habitus* legnoso dovuto a produzione di legno secondario o *habitus* erbaceo abbinato a ciclo annuale o biennale.

Differenziazione

Trasformazione di cellule embrionali in cellule specializzate.

Dioico

Si dice di un *taxon* rappresentato da individui a sessi separati (es.: *Juniperus* sp. pl.).

Diplocoria

Processo di disseminazione che si attua in due fasi distinte attraverso diversi vettori.

Diploide

Individuo con corredo cromosomico doppio (2n).

Disalatura

Eliminazione delle ali, strutture facenti parte di alcuni tipi di semi (es.: *Cedrus*, *Pinus*, *Abies*) durante la lavorazione del seme.

Disidratazione

Processo di eliminazione progressiva, parziale o totale dell'acqua contenuta in un organo o struttura.

Dispersione

Il trasferimento o movimento da un'area ad un'altra di semi, frutti o altri propaguli. Rappresenta il processo attraverso il quale una specie colonizza un nuovo habitat.

Disseccamento

Perdita di liquidi in un organismo o parte di esso.

Disseminazione

Dispersione naturale del seme e, in generale, di frutti, spore o altri organi preposti alla moltiplicazione sessuale.

Dormienza

Stato fisiologico, dovuto a cause fisiche e/o fisiologiche intrinseche, che impedisce la germinazione, anche in condizioni ambientali favorevoli. E' una caratteristica controllata geneticamente o fisiologicamente che interagisce in vario modo con i fattori ambientali.

Drenaggio

Grado di permeabilità del substrato pedologico e/o litologico.

Drupa

Frutto carnoso uni o pluricarpellare con endocarpo legnoso (nocciolo) contenente il seme e mesocarpo carnoso.

Duplicazione delle collezioni

Replica delle collezioni presso diverse strutture di una stessa istituzione o presso strutture di istituzioni differenti, al fine di assicurare una concreta conservazione *ex situ* delle accessioni, anche in caso di gravi danni o incidenti presso le strutture di origine.

Ecosistema

Insieme di più habitat presenti in un territorio geografico limitato e definito, entro il quale si verificano simili condizioni morfologiche, litostratigrafiche, pedologiche, bioclimatiche e biotiche.

Ecotipo

Popolazione vegetale o animale che si caratterizza per l'adattamento a particolari condizioni ecologiche; per i vegetali essenzialmente di tipo pedoclimatiche.

Ecotono

Zona di passaggio tra una cenosi ed un'altra (es.: l'orlo di un bosco è il passaggio da quest'ultimo a una cenosi aperta di tipo generalmente erbaceo).

Elaiosoma

Nei semi di alcuni frutti secchi si trova un'appendice non coinvolta nella germinazione, la cui funzione principale è quella di attirare gli animali (generalmente formiche, talora uccelli) che trovano una ricompensa commestibile e nel contempo provvedono alla disseminazione (Lisci *et al.*, 1996). Questa appendice è stata chiamata "elaiosoma" da Sernander (1906) perché contiene lipidi, ma anche caruncola, strofiolo, etc.

Elio filia

Preferenza di alcune piante dette anche fotofile, per l'irradiazione elevata e diretta del sole.

Embrione

Organismo in fase di sviluppo originatosi in seguito a un processo gamico e contenuto all'interno del seme nelle *Spermatophyta* o sviluppantesi sul gametofito delle *Pteridophyta*.

Endemismo

Taxon (es.: famiglia, genere, specie, sottospecie, varietà, cultivar, etc.) che per un fenomeno di stenocoria avente diversa origine, si ritrova in un'area limitata o ben circoscritta; presenta perciò un areale di distribuzione ristretto.

Endosperma primario

Tessuto di riserva aploide contenuto nel seme delle *Gymnospermae*, che si origina per proliferazione del gametofito femminile dopo il processo gamico.

Endosperma secondario

Tessuto di riserva normalmente triploide contenuto nel seme delle *Angiospermae*, originatosi in seguito al processo di doppia fecondazione.

Endozoocoria

Processo di disseminazione attuato dagli animali che prevede l'ingestione della diaspora e la sua successiva espulsione con le feci.

Entomofilia

Impollinazione ad opera di insetti pronubi.

Epicarpo

Parte più superficiale del pericarpo del frutto, generalmente membranosa e sottile (buccia).

Epicotile

Porzione dell'asse embrionale o della plantula collocato tra i cotiledoni e la prima foglia vera, destinata a formare il fusto.

Epidermide

Tessuto tegumentale che riveste le porzioni o gli organi giovani, quindi primari, di una pianta.

Epifite

Vegetali autotrofi che vivono su piante di maggiori dimensioni utilizzandole come supporto (es.: *Orchidaceae*) o per il proprio sostegno (es.: *Smilax aspera* L.). Generalmente non apportano danni apparenti all'ospite.

Epizoocoria

Disseminazione zoocora di semi e spore che si attaccano esternamente al corpo di animali (es.: mantello, zoccoli, etc.).

Ermafrodita

Fiore bisessuato che presenta cioè le strutture riproduttive sia maschili che femminili.

Esalbuminato (seme)

Vedi Albume.

Essiccazione

Processo, di durata variabile, che può avvenire in maniera naturale o artificiale attraverso attrezzature quali stufe o forni. Vengono sottoposti ad essiccazione i campioni d'erbario (*exsiccata*), così pure le piante officinali o singole parti delle stesse.

Estivazione

Sinonimo di stratificazione calda (vedere stratificazione e stratificazione calda del seme) e di *warming*.

Facoltà germinativa

La germinazione massima di un lotto di semi è chiamata "capacità germinativa" o, più frequentemente, "facoltà germinativa". Si definisce come la percentuale di semi in grado di germinare in particolari condizioni, entro un determinato periodo. La voce germinabilità è spesso impiegata come sinonimo.

Fecondazione

Fusione di due gameti con formazione di uno zigote.

Fenologia

Branca dell'ecologia che studia i rapporti tra i fattori climatici (umidità, temperatura, fotoperiodo) e la manifestazione stagionale di alcuni fenomeni della vita vegetale (germogliazione, fioritura, maturazione dei frutti, perdita delle foglie).

Fenotipo

Insieme dei caratteri morfologici scaturiti per diretta influenza ambientale.

Fermentazione anaerobica

Processo biologico di produzione di energia chimica in assenza di ossigeno.

Fitocenosi

Vedi associazione.

Fittone

Radice principale talvolta divisa. Ha origine dal colletto, in opposizione al fusto, ed ha uno sviluppo prevalente sulle altre radici secondarie.

Follicolo

Frutto secco deiscente originatosi da un solo carpello e che a maturità si apre in corrispondenza della linea di sutura del lembo.

Forma biologica

Categorie di risposta delle piante superiori alla stagione avversa, in base alla localizzazione delle gemme e alla loro distanza dal suolo.

Formaldeide

Composto (chimicamente: aldeide formica) tra i più utilizzati, in soluzione diluita, per la conservazione a lunga scadenza di campioni biologici.

Formazan

Composto azotato colorato, insolubile in acqua e derivante dalla riduzione di un sale di tetrazolio. Viene utilizzato per verificare nei tessuti vegetali l'attività degli enzimi ossidativi.

Formazioni

Termine di carattere fisionomico usato originariamente per esprimere l'insieme di diverse comunità. Oggi viene spesso utilizzato per definire un aggruppamento vegetale.

Fotoperiodo

Durata del periodo di illuminazione giornaliera; fattore che influisce sulla fisiologia delle piante e in particolare sulla germinazione.

Frutto

Organo vegetale che si forma dopo la fecondazione per modificazione strutturale dell'ovario racchiudente a maturità i semi. Definito come “vero” quando deriva esclusivamente dai carpelli di un fiore fecondato (in particolare della regione dell'ovario) e “falso” quando prende origine da parti accessorie come il ricettacolo.

Funicolo

Filamento costituito da un fascio conduttore avvolto da parenchima che inizia nella placenta e termina alla base della nocella dell'ovulo delle *Angiospermae* allo scopo di favorirne la nutrizione.

Galbulo

Strobilo tondeggianti tipici di alcune *Cupressaceae* (es.: *Juniperus* sp. pl.) costituito nella maggior parte da squame che, saldate in origine, si divaricano e si aprono in modo da favorire la dispersione dei semi.

Gamete

Cellule sessuali maschili o femminili che negli animali e nelle piante si fondono durante il processo di anfigamisia per formare lo zigote.

Gametofito

La generazione con numero cromosomico aploide (n) che produce gameti. Nelle *Spermatophyta* il gametofito maschile ha origine per mitosi dalla microspora prodotta nelle sacche polliniche (granulo pollinico), il gametofito femminile ha origine per mitosi dalla megaspora.

Gamica

Vedi Propagazione sessuale o gamica. Riguarda la fusione di due gameti.

Gel di silice

Sostanza amorfa, incolore e porosa, capace di assorbire acqua e altre sostanze; per tale motivo viene utilizzata come disidratante e decolorante.

Genotipo

Individuo geneticamente distinguibile (con geni o caratteri che lo distinguono da altri); un genotipo è anche la manifestazione di un allele diverso dello stesso gene o carattere (es.: la cerosità di una pianta di frumento è governata da un singolo *locus* genico che possiede diverse forme alleliche, la manifestazione di una delle possibili forme alleliche costituisce uno dei possibili genotipi che sono assolutamente identici per tutti i geni, fatta eccezione per un solo allele).

Geofite

Piante perenni con organi ipogei (es.: bulbi o rizomi) sui quali si trovano le gemme.

Germinabilità

In senso generale rappresenta la capacità di germinare. Si usa, talvolta, come sinonimo di facoltà germinativa (o capacità germinativa).

Germinazione

Processo fisiologico che corrisponde alla ripresa della crescita attiva dell'embrione contenuto nel seme che si manifesta con l'emissione della radichetta. Il processo germinativo è costituito da tre fasi: durante la prima avviene l'assorbimento d'acqua, nella seconda fase, considerata la più importante, le riserve vengono idrolizzate ed inizia la sintesi di enzimi e sostanze destinate allo sviluppo della plantula, mentre la terza fase inizia con l'emissione della radichetta. La germinazione può essere considerata ultimata quando la plantula ha prodotto una superficie fotosintetica in grado di provvedere al fabbisogno di carboidrati.

Germinazione epigea

Germinazione in cui i cotiledoni vengono portati al di sopra della superficie del terreno dall'allungamento dell'ipocotile.

Germinazione ipogea

Germinazione in cui i cotiledoni restano nel seme sotto la superficie del suolo mentre l'epicotile si allunga.

Germoglio

Porzione epigea di una pianta vascolare, costituita da fusto e foglie nelle prime fasi dello sviluppo a partire da un seme o da una gemma.

Germoplasma

È la base fisica dell'eredità, il complesso ereditario trasmesso da una generazione all'altra. Somma totale dei geni e dei fattori citoplasmici che governano l'ereditabilità, correntemente si intende per ta-

le l'informazione genetica presente nell'effettivo di una specie, nel suo insieme o di particolari ecotipi, razze, cloni o varietà.

Gibberelline

Ormoni vegetali che stimolano l'accrescimento e la germinazione, consentendo in certe condizioni di eliminare la dormienza di alcuni semi.

Gymnospermae

Spermatofite ad apparati riproduttori unisessuali, provviste di semi nudi cioè non racchiusi all'interno di un carpello, portati da scaglie o foglie specializzate in strobili.

Gineceo

Organo riproduttore femminile formato dal pistillo che occupa il verticillo più interno del fiore.

Glicerina

Polialcool utilizzato per conservare e stabilizzare materiale biologico fresco.

Granulo pollinico

Elemento riproduttore maschile delle *Spermatophyta*, inizialmente corrispondente ad una microspora che ha la funzione di trasportare il gametofito maschile in prossimità del gametofito femminile (vedi polline).

Habitat

Luogo che consente la vita di uno o più organismi e/o di una biocenosi, caratterizzato da proprietà fisiche e biotiche determinate.

HLS

Il modello HLS (hue, luminance, saturation) utilizza i concetti di tonalità, luminosità e saturazione per la caratterizzazione colorimetrica di un campione. La tonalità indica il tipo di colore; la saturazione descrive la purezza della tinta; la luminosità è legata all'intensità della luce, traducibile in livelli di grigio: a maggiore luminosità corrisponde maggiore vicinanza al bianco.

Ibridazione

Incrocio tra due individui appartenenti a *taxa* geneticamente differenti.

Ibrido

Individuo formatosi dalla fusione tra gameti appartenenti a entità tassonomicamente differenti.

Idrocoria

Disseminazione attraverso l'acqua di frutti, semi e di tutte le diaspore in generale.

Idrofite

Piante acquatiche generalmente con gemme sommerse durante la stagione sfavorevole. Possono essere o meno radicate al substrato; quelle emergenti e sommerse sono sempre fissate al substrato, mentre quelle galleggianti possono essere svincolate da quest'ultimo.

Igroscopico

Che ha tendenza ad assorbire acqua o umidità.

Ilo

Cicatrice presente sul seme in seguito al distacco dal funicolo.

Imbibizione

Assorbimento d'acqua liquida da parte del seme. Fenomeno di natura fisica precedente la germinazione.

Impollinazione

Trasporto del polline dagli apparati riproduttori maschili a quelli femminili.

Impollinazione diretta

Trasferimento del polline di un fiore sugli stimmi dello stesso fiore, sinonimo di autogamia (vedi autoimpollinazione).

Impollinazione indiretta o incrociata

Trasferimento del polline tra fiori diversi della stessa pianta o tra fiori di piante differenti appartenenti alla medesima specie.

Incubatore

Strumento utilizzato nelle prove di germinazione che consente di valutare la risposta a temperature costanti e generalmente al buio.

Indeiscente

Si dice di un frutto che a maturità non si apre per liberare i suoi semi.

Index Seminum

Elenco dei semi di un orto botanico o di una banca del germoplasma disponibili per scambi *pro mutua commutatione* con altre istituzioni, sempre con finalità scientifiche senza fini di lucro.

Indigo Carmine

Composto chimico che permette di realizzare un test colorimetrico indicante la vitalità dei semi. Le parti sane non si colorano, i tessuti morti si colorano in blu.

Individuo

Entità biologica caratterizzata da uno specifico patrimonio genetico, fisicamente indipendente e capace di vita autonoma.

Infiorescenza

Insieme di fiori disposti in una struttura comune (es.: corimbo, ombrella, racemo, etc.).

Infruttescenza

Insieme di frutti disposti in un'unica struttura originatesi da una infiorescenza compatta, in numero variabile su di un asse principale, semplice o ramificato.

Inquilinismo

Particolare tipo di simbiosi in cui una specie animale convive con una specie diversa occupando uno spazio comune.

Insolazione relativa

Indica il rapporto tra le ore effettive di soleggiamento e quelle che sarebbero possibili nel medesimo luogo prescindendo dagli ostacoli e dalle condizioni di esposizione ed inclinazione.

Invaiaura

Il momento in cui il frutto comincia ad assumere il colore definitivo della maturazione.

Ipocotile

Asse embrionale che collega la radichetta con i cotiledoni.

Lavaggio dei semi per interrompere la dormienza

Pretrattamento consistente in un lavaggio di qualche ora in acqua o in un altro liquido ad una data temperatura, mirante ad eliminare eventuali inibitori della germinazione presenti nel seme.

Legume

Frutto secco deiscente monocarpellare che si apre attraverso due fessure longitudinali, una corrispondente alla zona di saldatura dei bordi carpellari e l'altra alla nervatura del carpello (es.: *Fabaceae*).

Loculicida

Frutto deiscente che si apre con fessurazioni in corrispondenza della linea dorsale mediana di ciascun carpello.

Loculo

Una delle logge in cui è suddivisa una struttura concamerata.

Locus genico

Sulla catena del DNA indica la posizione in cui è presente un determinato gene. Vedi anche Alleli.

Lotto

Una specifica quantità di germoplasma di qualità ragionevolmente uniforme. Risulta dalla raccolta, in una determinata popolazione, in un'unica data di una definita quantità di germoplasma (vedi accessione).

Macerazione

Operazione consistente nel trattare con acqua o altro solvente liquido i frutti carnosì per separare le parti polpose da quelle dure (es.: i semi dal tessuto carnoso delle bacche).

Macrobioclina

Rappresenta l'unità di più alto rango nella classificazione bioclimatica. Si tratta di modelli biofisici determinati per effetto di valori latitudinali, climatici e vegetazionali. Sulla terra si riconoscono 5 macrobioclimi: tropicale, mediterraneo, temperato, boreale e polare.

Macrosporofilli

Foglie fertili specializzate nel portare strutture riproduttive femminili nelle tracheofite.

Manipolazione (dei semi)

L'insieme delle operazioni (es.: pulitura, vagliatura, selezione, etc.) cui il seme è sottoposto dall'ingresso in banca al suo stoccaggio.

Maturazione dei semi

Processo fisiologico che porta i semi presenti sulla pianta allo stadio ottimale per la dispersione. Al momento della maturazione i semi sono in condizioni idonee per poter essere indipendenti dalla pianta madre e per poter successivamente dare origine a nuovi individui. La maturazione non è tuttavia sempre il momento in cui i semi presentano la massima germinabilità: essi possono presentare dormienza o avere necessità di postmaturazione.

Meiosi

Divisione cellulare (detta anche divisione riduzionale) che a partire da una cellula diploide forma quattro cellule aploidi. Consta di due successive divisioni con la duplicazione del materiale genetico. Avviene in una cellula specializzata rappresentata dalla cellula madre delle spore nei cicli aplo-diplonti, nello zigote nei cicli aploidi, nelle gametocisti nei cicli diplonti.

Membrana cellulare

Doppio strato lipidico in cui sono immersi complessi proteici e che delimita la cellula vivente regolando i suoi scambi con l'esterno.

Mericarpo

Singole porzioni in cui si divide lo schizocarpo a maturità, originatosi da un ovario pluricarpellare apocarpico o talora sincarpico. Un mericarpo corrisponde ad un achenio.

Mesocarpo

Strato mediano parenchimatrico interposto tra epicarpo ed endocarpo, solitamente carnoso.

Metapopolazione

Un insieme di sub-popolazioni separate spazialmente, ma connesse funzionalmente dalla capacità dispersiva dei loro componenti.

Micosi

Patologia causata da funghi parassiti (= miceti).

Microclima

Insieme delle condizioni climatiche caratteristiche di una ridotta porzione di territorio (es.: microclima di una grotta).

Micorrize

Associazioni mutualistiche tra le radici della maggior parte delle specie vegetali (circa il 90%) e i funghi del terreno che danno luogo a rapporti simbiotici con reciproco vantaggio. Si distinguono in endo ed ectomicorrize.

Micropilo

Apertura apicale dell'ovulo preposta alla cattura del polline che così può raggiungere la nocella.

Microsporofilli

Foglie fertili modificate portanti le strutture riproduttive maschili nelle tracheofite, le quali differenziano le cellule madri delle microspore.

Midollo

Tessuto parenchimatico che occupa la parte centrale del fusto e della radice nelle strutture secondarie.

Mirmecocoria

Processo di disseminazione attuato dalle formiche.

Mitosi

Divisione nucleare di una cellula eucariotica durante la quale ciascuna delle due cellule figlie riceve un corredo cromosomico uguale a quello della cellula madre.

Moisture content (del seme)

Termine inglese che indica il contenuto di umidità interna del seme ovvero il peso dell'acqua contenuta (espresso in percentuale), rispetto al peso fresco del campione.

Moltiplicazione (germoplasma)

Processo con cui viene incrementato il numero di individui a partire da un pool limitato di essi (materiale di moltiplicazione). In alcuni settori (es.: ornamentale) in cui è particolarmente diffusa la propagazione asessuale delle piante, essa viene indicata anche come moltiplicazione, in contrapposizione alla riproduzione (propagazione per via sessuale).

Monitoraggio

Ogni forma di osservazione sistematica e di rilevamento esercitata su uno o più organismi viventi, popolazioni o fenomeni naturali.

Monocarpica

Pianta annuale o perenne che fiorisce e fruttifica una sola volta durante la vita (es.: *Agave* sp. pl., *Verbascum* sp. pl.).

Monocline

Fiore dotato sia dell'apparato sessuale maschile sia di quello femminile. Pianta monoica a fiori bisessuali o ermafroditi.

Monocotiledoni

Termine generico riferito al gruppo di *Angiospermae* caratterizzato da un embrione con un solo cotiledone, da foglie parallelinervie, fiori trimeri, fasci atactostelici e assenza di cambio interfasciale.

Monoica

Specie in cui lo stesso individuo porta apparati riproduttori maschili e femminili. Contrario di Dioica.

Morfometria

Studio quantitativo dei caratteri morfologici di organismi viventi o di parti di essi.

Morfotipi

Tipi tassonomicamente e geneticamente non definiti, ma morfologicamente ben differenziati.

Mutualismo

Associazione tra individui di specie differenti che comporta vantaggio per entrambi ma che non costituisce un vantaggio obbligato.

Naturalizzata

Specie aliena introdotta con la coltura o accidentalmente diventata spontanea in quanto capace di riprodursi autonomamente e quindi di compiere l'intero ciclo biologico.

Nicchia ecologica

Porzione di habitat caratterizzata da condizioni abiotiche peculiari (es.: microclima) adatte e/o necessarie per la sopravvivenza e lo svolgimento di parte o dell'intero ciclo vitale di una o più specie vegetali e/o animali.

Nocella

Porzione interna dell'ovulo delle *Spermatophyta*, costituita da un tessuto diploide da cui si differenzia la cellula madre delle macrospore. Corrisponde al megasporangio.

Nucula o noce

Frutto secco indeiscente pluricarpellare monospermo (es.: *Fagaceae*, *Polygonaceae*).

Ombrotipo

Unità che esprime il quoziente tra le precipitazioni medie (mm) e la sommatoria in gradi centigradi di quei mesi in cui la temperatura media è superiore a 0°C.

Origine

Viene così descritto dal D. Leg. 386/2003: per un soprassuolo o una fonte di sementi autoctoni, l'origine è il luogo dove si trovano gli alberi. Per un soprassuolo o una fonte di semi non autoctoni, l'origine è il luogo da cui i semi o le piante sono state originariamente introdotti. L'origine di un soprassuolo o di una fonte di semi può essere sconosciuta.

Ornamentazione

Disegni, macchie o strutture che caratterizzano il tegumento dei semi.

Ornitocoria

Disseminazione di frutti, semi e spore ad opera di uccelli.

Orofitia

Pianta che predilige le zone montuose e in particolare le aree cacuminali.

Ortet

Un ortet è un individuo che si sviluppa da seme, quindi da due genitori per via sessuale e che in seguito, per clonazione, dà origine a dei nuovi individui geneticamente identici (cloni).

Ovario

Porzione basale del pistillo contenente gli ovuli; può essere supero (cioè posizionato nella parte più elevata del ricettacolo), infero (cioè immerso nel ricettacolo o completamente avvolto da esso) o semi-infero (quando si inserisce su un ricettacolo leggermente concavo). Dà origine al frutto dopo la fecondazione.

Ovulo

È la struttura riproduttiva che dà origine al seme dopo la fecondazione; è formato da uno o due tegumenti, dalla nocella e dal gametofito femminile che occupa la porzione più interna.

Pacciamatura

Copertura del terreno, dopo semina o trapianto, messa in atto per ripararlo dal gelo, innalzarne la temperatura e limitarne l'evaporazione, in modo da proteggere o accelerare la crescita. Può essere praticata con paglia, strame, foglie, corteccia di resinose oppure con cartone catramato, fogli di polietilene, biofetri, etc. Questa tecnica viene adottata anche per difendere le piante legnose dall'invasione da parte di piante erbacee.

Pappo

Struttura formata da peli, setole o squame inserite a una estremità dei semi (es.: *Apocynaceae*) o dei frutti (es.: *Asteraceae*) atta alla disseminazione anemocora.

Parassitismo

È una forma di associazione biologica tra due specie di organismi nella quale l'una ha vantaggio (es.: nutrimento, protezione, etc.) a spese dell'altra. La prima specie è detta parassita la seconda ospite.

Partenocarpia

Formazione e sviluppo di frutti senza che avvenga la fecondazione.

Partenogenesi

Sviluppo virginale di un gamete (o gametangio) senza l'unione con un altro gamete. Può essere aploide o diploide.

Patogeno

Microrganismo che provoca una patologia.

Pedologia

Scienza che studia l'origine, la formazione, la composizione chimica, l'evoluzione dei suoli e gli effetti indotti dalle biocenosi che con essi interagiscono.

Pericarpo

Nelle *Angiospermae* è l'insieme dei tessuti che formano il frutto, derivante dalla trasformazione delle pareti dell'ovario dopo la fecondazione. Il pericarpo può essere indifferenziato o suddiviso in due o tre parti: epicarpo, mesocarpo ed endocarpo. Può essere membranoso o coriaceo nei frutti secchi, carnoso o succoso nei frutti carnosì.

Perisperma

Tessuto derivato dal parenchima nucellare a seguito della doppia fecondazione e accumulante la maggior parte delle riserve di alcuni semi.

Peso fresco dei semi

Peso dei semi selezionati e puliti prima che subiscano processi di deidratazione.

Peso fresco dell'accessione

Peso dell'accessione al momento dell'ingresso in banca, senza che abbia subito alcun processo di deidratazione o di selezione/pulizia.

Peso target

Peso dell'accessione che corrisponde ad un determinato valore di contenuto di umidità interna (mc%).

Phylum

In termini tassonomici è un raggruppamento di classi e rappresenta la "Divisione" (plurale *phyla*).

Pietrosità

Presenza percentuale di pietre su una determinata superficie.

Pioniera

Specie dotata di capacità colonizzatrice in ambienti fortemente selettivi (es.: dune sabbiose), in grado di preparare il terreno per la colonizzazione da parte di specie più esigenti.

Piumetta

La prima formazione di gemma dell'embrione di una pianta destinata a svilupparsi nel germoglio.

Placenta

La porzione del carpello dove si inseriscono gli ovuli; generalmente risulta ingrossata.

Plantula

A rigore il termine designa la piantina contenuta allo stato embrionale nel seme delle *Spermatophyta*, ma in senso più lato si usa anche per indicare la giovane piantina nei primi stadi di sviluppo, quando la sua crescita si svolge ancora a spese delle riserve alimentari contenute nel seme. Nella plantula si distinguono essenzialmente tre regioni: una plumula, che rappresenta l'apice meristematico dal quale si sviluppano tutte le parti della pianta situate al di sopra del primo nodo del fusto; un fusticino, parte assile compresa fra il colletto e il primo nodo; una radichetta, dalla quale avrà origine l'intero apparato radicale.

Plumula

Vedi Piumetta.

Pluricarpica

Pianta che fruttifica più volte durante la vita.

Policoria

Processo di dispersione non specializzato che si attua in stadi differenti attraverso diversi vettori.

Policormico

Che presenta parecchi fusti anziché uno solo principale.

Polimorfismo

Presenza di più forme con cui si presenta una stessa entità (es.: una specie); il polimorfismo può derivare da cause genetiche (variabilità genetica) o ambientali (forme stagionali).

Pollenkitt

Sostanza composta da lipidi, proteine e pigmenti che riveste le sculture del granulo pollinico con un sottile strato oleoso o con gocce; serve come protezione e per permettere migliore adesione ai peli degli insetti.

Polline

Il termine polline deriva dal latino “pollen” e significa “fine farina”. Fu usato per la prima volta dal medico tedesco Valerius Cordus (1515-1544) che aveva osservato nelle antere del giglio un *Rubiginosus pulvisculus* che ritrovò poi in altri fiori. Grazie all’invenzione del microscopio, nel XVII secolo, l’osservazione di questa “polvere” fu affinata da Grew e da Malpighi che quasi simultaneamente pubblicarono disegni e prime descrizioni dei granuli pollinici.

Dopo il processo di meiosi il polline è da considerarsi una spora, stadio uninucleato, successivamente a seguito di ripetute divisioni mitotiche diventa il gametofito maschile portatore di cellule o gameti maschili delle piante a seme.

Pollone

Germoglio che si sviluppa in seguito a taglio di fusti o rami. Si distinguono polloni veri (da gemme di fusti e rami) e polloni radicali (da gemme radicali).

Popolazione

Gruppo di individui, caratteristici di un dato territorio, aventi antenati comuni che tendono a riprodursi tra loro piuttosto che con individui di una altra popolazione.

Postmaturazione

Processo di sviluppo dei semi dopo la raccolta o abscissione dei frutti, durante il quale continuano la loro maturazione fisiologica. Quando si riferisce a determinati tipi di dormienza, indica il periodo necessario per rimuoverla. Se il termine è riferito alla lavorazione di frutti e semi indica il periodo in cui avviene la perdita naturale del contenuto d’acqua.

Potenziale idrico

Rappresenta l'energia potenziale dell'acqua ed è data dallo spostamento delle molecole d'acqua da un posto all'altro grazie alle differenze nei potenziali di energia, sia nel mondo vivente che in quello non vivente. Questo parametro predice il senso del movimento dell'acqua dentro i semi e nel suolo, in modo tale che l'acqua si sposterà sempre dal potenziale idrico maggiore (meno negativo) verso il minore (più negativo).

Preheating

Vedi stratificazione calda.

Pretrattamento (del seme)

Azione che permette di eliminare la dormienza dei semi e di rendere massima la velocità e l'uniformità della germinazione. Ci sono pretrattamenti che hanno scopi diversi come disinfezione, confettatura, etc.

Propagazione vegetativa o agamica

Produzione di nuove piante al di fuori del processo gamico, con la formazione di individui con caratteristiche genetiche identiche a quello di partenza; si attua attraverso radicazione di talee, innesto, propaggine, divisione di cespo, micropropagazione, bulbilli, etc.

Propaggine

Modalità di propagazione vegetativa in cui la formazione delle radici del nuovo individuo avviene su una parte della pianta (di solito un ramo flessibile) ancora attaccata alla pianta madre.

Protocollo di germinazione

Insieme di azioni o di procedimenti (compresi pretrattamenti da applicare) tendenti ad ottenere una germinazione ottimale per una specie da un dato lotto di semi.

Prova con diacetato di fluoresceina

Rappresenta un tipo di saggio colorimetrico e una stima rapida della vitalità dei semi. All'interno delle cellule vitali aventi membrane integre l'enzima esterasi trasforma il diacetato di fluoresceina in un prodotto fluorescente. Attraverso l'uso di microscopi a fluorescenza e filtri è possibile la quantificazione degli embrioni vitali e di quelli danneggiati.

Prova di conducibilità

Valuta l'integrità di tessuti e membrane cellulari, quindi indirettamente la qualità del seme. Il seme con membrane danneggiate, sottoposto ad imbibizione subisce una perdita di contenuti cellulari (ioni, carboidrati, etc.) che condiziona i valori di conducibilità elettrica.

Provenienza

Il popolamento da cui è stato prelevato il seme. Si intendono come provenienze originarie quelle il cui materiale di base è autoctono. Si intendono come provenienze artificiali quelle da boschi di specie esotiche che vengono usati, per il loro valore, come popolamenti da seme. Entrambi i tipi possono fornire materiale selezionato e/o provato, qualora siano state effettuate sperimentazioni.

Psammofila

Specie adattata agli ambienti sabbiosi costieri e non (es.: dune).

Purezza del seme

In un lotto di semi è la percentuale in peso di semi puliti e intatti della specie considerata. Semi estranei e materie inerti sono considerati impurezze.

Quarantena

Periodo di sicurezza durante il quale i lotti destinati alla banca vengono stoccati in locali riservati e separati dalla stessa, al fine di valutare la presenza di parassiti o di eventuali patologie (es.: micosi).

Ramet

Replica vegetativa, geneticamente identica, di un clone a partire da un individuo ancestrale (ortet). Singolo modulo o insieme di fusti facilmente identificabile e comparabile, detto anche individuo funzionale.

Range ecologico

L'insieme delle differenti condizioni ecologiche (es.: *range* altimetrico) in cui una specie può adattarsi, crescere e riprodursi.

Resilienza ecologica

E' la capacità di un sistema che abbia subito un impatto negativo (es.: incendio o taglio di un bosco) di ristabilire l'equilibrio omeostatico. Essa riflette le possibilità che il sistema ha di tornare a livelli di qualità accettabili. Sono numerose le caratteristiche che descrivono la resilienza, tra cui l'elasticità e l'ampiezza di riposta. Nel primo caso si intende la velocità con cui il sistema è in grado di ripristinare lo stato iniziale dopo la perturbazione; nel secondo, invece, si fa riferimento al livello di modifica rispetto alla condizione iniziale che il sistema può sopportare essendo poi in grado di ritornare allo stato iniziale.

Resistenza ecologica

E' la capacità di un sistema di reagire evitando modifiche rispetto allo stato originario durante un episodio di disturbo o di impatto negativo.

RGB

Acronimo dell'inglese Red Green Blue (rosso verde blu). In informatica, codifica del colore, impostata come combinazione dei 3 colori primari rosso, verde e blu. Variando le percentuali di ognuno di tali colori, si ottiene la gamma dal bianco (nel quale la percentuale di ognuno dei colori è zero) al nero, che si ottiene con tutti e tre i colori contemporaneamente al 100%. La tecnologia RGB viene utilizzata nei televisori e nei monitor, ed è realizzata attraverso una serie di punti, ognuno dei quali è composto da altri tre puntini più piccoli che corrispondono ai tre colori primari. Il meccanismo è detto di sintesi additiva, al contrario di quello di sintesi sottrattiva utilizzato nella stampa e nella fotografia.

Rinaturalizzazione (o Rinaturazione)

Operazione di ripristino di ambienti artificializzati che consente di riportarli al loro stato originario in tempi variabili e dipendente sia dalle condizioni ambientali (es.: clima), sia dal cessare del fattore di disturbo.

Riposo vegetativo

Si intende il periodo durante il quale lo sviluppo della pianta viene rallentato fino alla quiescenza, per consentire il superamento della stagione avversa (es.: freddo invernale, aridità estiva).

Riproduzione sessuale

Fusione gametica da cui si origina il seme, organismo nuovo e diverso geneticamente da entrambi i genitori.

Ritardo di germinazione

Tempo necessario all'inizio della germinazione di semi posti in condizioni favorevoli.

Rizoma

Fusto sotterraneo, solitamente orizzontale, senza clorofilla e le cui foglie sono ridotte a squame ricche di riserve, dal quale nascono i fusti aerei, le foglie e le radici.

Rocciosità

Presenza percentuale di roccia affiorante in una determinata superficie.

Samara

Frutto secco monocarpellare indeiscente e monospermo, provvisto di un'ala membranacea che ne facilita il trasporto ad opera del vento (achenio alato).

Scapi fiorali

Assi fioriferi allungati, fogliari o privi di foglie, che si dipartono direttamente da una struttura vegetativa epigea di riserva (come in molte *Liliaceae*) o dalle radici (es.: terofite) e portano all'apice un fiore o una infiorescenza.

Scarificazione

Pretrattamento che produce abrasioni o incisioni del tegumento seminale con mezzi meccanici, fisici o chimici. Favorisce l'assorbimento dell'acqua e lo scambio dei gas, permettendo di eliminare delle inibizioni tegumentarie alla germinazione. La scarificazione fisica si effettua generalmente tramite acqua calda, mentre in quella chimica i semi sono sottoposti ad immersione in un acido (o base) forte. La scarificazione meccanica si opera manualmente (sfregamento con carta vetrata, foratura, taglio, etc.) oppure tramite scarificatori azionati ad energia elettrica.

Schizocarpo

Frutto secco indeiscente che si divide a maturità in diversi mericarpi (es.: diachenio delle *Apiaceae*).

Sciafila

Specie vegetale in grado di tollerare o addirittura prediligere condizioni di scarsa illuminazione (es.: specie nemorali).

Sclerofille

Piante con foglie ricche in tessuti sclerenchimatici, pertanto indurite e con scarso contenuto in acqua (es.: *Pistacia lentiscus* L.).

Segregazione

Indica la trasmissione indipendente alla progenie dei caratteri determinati dai geni portati su ciascuna copia dei cromosomi. La trasmissione indipendente fa sì che possa ripresentarsi, anche dopo più generazioni, un carattere precedentemente mascherato dall'interazione del gene responsabile col restante DNA.

Selezione del seme

Nell'ambito delle operazioni legate alla lavorazione del seme s'intende l'estrazione del seme dal frutto, la pulizia dalle impurità, la disalatura, la separazione dai semi vani e la calibratura.

Seme

Organo delle *Spermatophyta* capace di dare origine a una nuova pianta; deriva dall'ovulo fecondato ed è costituito dall'embrione, accompagnato o meno da endosperma o albume, protetto da tegumenti rigidi e spesso induriti.

Seme intermedio

Semi che sopportano meglio la deidratazione rispetto ai recalcitranti, ma peggio in rapporto agli ortodossi. Una volta deidratati (parzialmente) non tollerano lo stress procurato dalle basse temperature (inferiori allo 0°C) ma si comportano meglio se esposti a temperature più miti (intorno a 15°C).

Seme ortodosso

Seme che mantiene per lunghi periodi la facoltà germinativa se portato a un ridotto contenuto di umidità (5-6 %) e conservato a basse temperature in contenitori ermetici.

Seme pregerminato

Seme nelle primissime fasi della germinazione, generalmente trovantesi in tale situazione in seguito a qualche trattamento. Mostra, di solito, i tegumenti seminali spaccati e/o la radichetta. Termine utilizzato nella pratica vivaistica, quando si impiega per la semina seme che ha già iniziato a germinare. A volte si usa come sinonimo di "seme germinato prematuramente" nel cumulo di stratificazione.

Seme recalcitrante

Seme che perde rapidamente la germinabilità se il contenuto di umidità scende al di sotto di livelli critici (variabili tra il 20 e il 50%). Non tollera lunghi periodi di conservazione ed è caratterizzato da tenori idrici molto elevati al momento della disseminazione (es.: *Araucaria araucana* K. Koch., *Aesculus hippocastanum* L., *Quercus* sp. pl, etc.). Presenta generalmente dimensioni relativamente grosse e peso elevato in ragione dell'alto contenuto di umidità al momento della disseminazione (può variare tra il 30 ed il 70%). Si ipotizza che in questa categoria di semi la germinazione inizi al momento stesso della disseminazione, da cui i danni causati da eventuali diminuzioni del loro livello di umidità. Poiché in alcuni casi gli embrioni possono sopportare una perdita di umidità più spinta che l'intero seme, si pensa che la disidratazione controllata seguita da criopreservazione in azoto liquido sia una tecnica promettente per la conservazione del germoplasma di specie con semi recalcitranti. Per alcuni semi recalcitranti di zone temperate (es.: *Quercus*) sono state messe a punto tecniche che consentono la conservazione della vitalità per 3-5 anni: i semi nudi, o mischiati a torba asciutta, vengono tenuti a -2°C in contenitori che consentano lo scambio dei gas.

Semenzale

Pianta giovane ottenuta da seme.

Semina

Processo con cui il seme viene messo in condizioni favorevoli per germinare.

Semina a gruppi

Disposizione dei semi in piccoli gruppi tra loro regolarmente distanziati.

Semina a linee

Disposizione dei semi in linee secondo distanze predeterminate.

Semina a spaglio

Si effettua spargendo il seme in modo uniforme ma casuale (a mano o con apposite macchine).

Siliceo (terreno)

Derivante da roccia ricca in silice.

Simbionti

Microrganismi quali batteri, funghi e alghe viventi in simbiosi (comunità) con un organismo superiore (pianta).

Sito di raccolta

Luogo nel quale viene raccolto il materiale vegetale.

Spermatofite

Piante vascolari che si riproducono e si diffondono mediante semi.

Spora

Cellula riproduttiva vegetativa a pareti ispessite che può derivare da un processo di meiosi (meiospore) o di mitosi (mitospore).

Stame

Struttura riproduttiva maschile del fiore delle *Angiospermae*, composta dall'antera, contenente il polline, e dal filamento.

Stato fitosanitario

Condizioni in cui si trova un organo o una pianta intera in rapporto alla contaminazione o all'attacco da parte di microrganismi patogeni.

Stazione

Località caratterizzata per mezzo di parametri fisici e geografici nella quale è stata effettuata la raccolta del materiale vegetale. Secondo le dimensioni della stazione si possono definire anche macrostazioni e microstazioni.

Stilo

Struttura cilindrica e sottile di collegamento fra lo stimma e l'ovario.

Stimma

Parte superiore del carpello, in genere espansa, deputata alla cattura del polline.

Stoccaggio

Indica l'immagazzinamento e la conservazione a condizioni e parametri ambientali definiti di strutture vegetali, per esempio i semi, in condizioni idonee a mantenere più a lungo possibile le loro caratteristiche iniziali.

Stoloni

Ricacci laterali aerei o sotterranei con internodi molto allungati e foglie ridotte che radicano ad una certa distanza dalla pianta madre e che dopo la morte del pezzo intermedio si sviluppano come individui autonomi.

Stratificazione

Procedimento consistente nella disposizione a strati dei semi in un substrato soffice e umido, costituito generalmente da torba, agriperlite, sabbia o vermiculite utilizzati singolarmente oppure mescolati tra di loro in varie proporzioni, con l'obiettivo fondamentale di rimuovere la dormienza. Il rapporto in volume seme/substrato può variare da 1:1 a 1:3 circa. In certi casi può risultare più pratico mescolare direttamente semi e substrato. I semi di ridotte dimensioni o di colore simile al substrato, vanno sistemati tra teli o altro materiale permeabile per consentire un loro più facile recupero alla fine del trattamento. La stratificazione condotta a basse temperature (tra +2°C e +6°C), in ambienti controllati (frigoriferi, celle, etc.) oppure all'aperto (cassoni, buche scavate nel terreno, etc.), viene chiamata stratificazione fredda, vernalizzazione o *chilling*. La stratificazione del seme condotta intorno ai +20°C, invece, si chiama stratificazione calda, estivazione o *warming*. In entrambi i casi è fondamentale mantenere un buon livello di umidità del substrato, evitando ristagni d'acqua ed assicurare temperature costanti ed uniformi in tutta la massa. La stratificazione condotta in condizioni controllate di laboratorio, sia calda (*warming* o estivazione) sia fredda (*chilling* o vernalizzazione) viene generalmente effettuata negli stessi contenitori (detti germinatoi) in cui sono successivamente svolte le prove di germinazione. Nei trattamenti fatti all'aperto, dove le oscillazioni di temperatura ed umidità sono più probabili, è raccomandabile irrigare quando necessario, assicurando il drenaggio delle acque ed isolare termicamente il cumulo, sistemandolo in buche abbastanza profonde, oppure disponendolo in luoghi non soleggiati sotto la copertura di uno strato materiale coibente (terra, sabbia, teli di juta, fogliame, etc.). Per questioni di spazio, vengono generalmente stratificati in questo modo i semi di grosse dimensioni (noci, nocciole, ghiande, etc.) che devono essere accuratamente protetti anche dai roditori con reti, esche avvelenate e repellenti. Per il controllo di alcuni funghi presenti nei tegumenti esterni dei semi, che trovano nella stratificazione condizioni favorevoli di sviluppo, si può ricorrere all'immersione delle sementi in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2% di cloro attivo per 10 minuti. Poiché è di gran lunga più diffusa la stratificazione fredda, quando si impiega il termine 'stratificazione', senza specificare se 'calda' (vedere stratificazione calda) o 'fredda' (vedere stratificazione fredda), si intende la vernalizzazione. L'azione benefica dei trattamenti termici (caldo-umidi, freddo-umidi o la loro combinazione alternata) sul processo germinativo, si esprime attraverso alcuni effetti principali: rimozione dei diversi tipi di dormienza, aumento della velocità ed

uniformità della germinazione e della germinabilità totale, allargamento della gamma di temperatura entro la quale è possibile la germinazione, diminuzione del fabbisogno di luce per le specie la cui germinazione è favorita da questo fattore, minimizzazione delle differenze qualitative delle sementi imputabili alle diverse tecniche di raccolta, di lavorazione e di conservazione. In linea generale, i semi conservati richiedono periodi di stratificazione più lunghi rispetto a quelli applicabili alla semente di recente raccolta. D'altra parte, i campioni caratterizzati da scarso vigore germinativo vanno sottoposti a trattamenti termici più brevi di quanto riferito in letteratura.

Stratificazione calda (estivazione, *preheating* o *warming*)

Stratificazione del seme (vedere) condotta intorno ai +20°C.

Stratificazione fredda (vernalizzazione o *chilling*)

Stratificazione (vedere stratificazione del seme) condotta a temperature generalmente comprese tra +2°C e +5°C.

Stratificazione senza substrato

Stratificazione del seme con se stesso, generalmente dopo immersione in acqua per 24-48 ore e sgocciolamento. A questo fine il seme viene generalmente sistemato in sacchi di plastica, non chiusi ermeticamente per consentire lo scambio gassoso, in ambiente termicamente controllato (es.: frigorifero). E' consigliabile collocare non più di 10-12 Kg di semente imbibita per sacco e rimescolare periodicamente. L'emanazione di odore alcoolico dopo un periodo di vernalizzazione indica respirazione anaerobica a conseguenza di limitata aerazione. Molte specie (es.: *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Alnus cordata*, etc.) danno buone risposte a questo tipo di trattamento, senza che si verifichino problemi di ordine sanitario. E' ovvio che la stratificazione del seme senza substrato consente un notevole risparmio di spazio ed una semplificazione delle operazioni manuali per cui è da preferire ai sistemi tradizionali ogni qualvolta risulti efficace. La stratificazione di seme nudo va effettuata a temperature più basse (+3°C circa) rispetto a quelle della vernalizzazione tradizionale (+5°C circa) e generalmente dà migliori risultati in trattamenti piuttosto brevi.

Strobilo

Struttura riproduttiva tipica delle *Gymnospermae*, costituita dall'insieme di micro o macrosporofilli o squame fertili disposti su un asse allungato. Viene detto anche cono o pigna.

Strofiolo

Parte carnosa del seme derivante dal funicolo.

Successione

Avvicendamento temporale di comunità vegetali in uno stesso luogo.

Suffrutice

Pianta perenne con base legnosa e con getti di consistenza erbacea che si rinnovano ogni anno.

T50

Parametro utilizzato per determinare la velocità di germinazione espresso in numero intero di giorni corrispondenti al tempo necessario per ottenere il 50% della capacità germinativa del lotto di semi.

Talea

Porzione di ramo o di radice usata per propagare vegetativamente la pianta.

Tasso di mortalità

Indice di decremento di una popolazione.

Tasso di natalità

Indice di crescita di una popolazione.

Tavola densimetrica

Macchina dotata di un piano oscillante e vibrante su cui i semi si separano in gradienti di diverso peso specifico.

Taxon

Gruppo sistematico indipendentemente dal rango (es.: specie, genere, famiglia, etc.).

Tegumento (del seme)

Rivestimento dell'ovulo costituito da uno o due strati aventi funzione di protezione e isolamento dall'ambiente esterno. Dopo la fecondazione si ispessisce e modifica la sua struttura per una migliore protezione delle parti interne del seme.

Temperatura ottimale

La temperatura a cui la crescita della pianta o, in generale, il manifestarsi di un fenomeno avvengono il più rapidamente possibile.

Tempo medio di Germinazione (TMG)

È un modo di esprimere la velocità della germinazione. Si definisce come la sommatoria (da 1 a n) dei prodotti tra i semi germinati e il giorno in cui è avvenuta la loro germinazione, il tutto diviso per il numero totale dei semi germinati alla fine della prova. Una germinazione veloce è caratterizzata da un TMG basso.

Termobilancia

Analizzatore elettronico di umidità che contemporaneamente pesa e disidrata i semi calcolando la differenza in peso percentuale. Rappresenta un metodo di misura dell'umidità di tipo distruttivo.

Termoperiodo

Il fattore che influenza lo sviluppo di una pianta attraverso l'alternanza di temperatura tra il giorno e la notte.

Termotipo

Unità che esprime un concetto di sommatoria dei valori relativi alle temperature massime, medie e minime mensili o annuali. Ogni tipologia termotipica prevede un orizzonte inferiore e superiore.

Terofite

Piante annuali che superano la stagione avversa sotto forma di semi.

Tessuti meristematici

Insieme di cellule indifferenziate che hanno mantenuto inalterata la capacità di dividersi e la cui funzione principale è quella di proliferare dando origine a nuove cellule che andranno incontro a processi di differenziamento. Sono detti anche tessuti embrionali.

Testa

Tegumento esterno del seme dotato o meno di punte, uncini, peli, ali aventi un ruolo nella sua disseminazione.

Test a freddo (*Cold-test*)

Si tratta di un test generalmente utilizzato per stimare il vigore dei semi di grano e di soia. I semi vengono seminati nel terreno o su carta bibula ed esposti al freddo per un periodo specifico durante il quale subiscono l'influenza della temperatura, dell'imbibizione e di microrganismi. A seguito di questo trattamento i semi vengono trasferiti in condizioni ottimali per la loro germinazione.

Tetrachenio

Frutto secco indeiscente composto da quattro mericarpi (es.: *Boraginaceae* e *Lamiaceae*).

Tetrazolio

Composto chimico (cloruro o bromuro di 2,3,5-trifenil tetrazolio) che permette di realizzare un test biochimico (TTC) indicante la vitalità dei semi. Le parti vitali si colorano in rosso.

Tipo corologico

Individua le aree geografiche all'interno delle quali si rinviene un dato *taxon* (es.: *Quercus suber* L. è una specie W-Medit.)

Tomografia assiale computerizzata (TAC) del seme

È una particolare tecnica radiografica applicata all'analisi dei semi che fornisce immagini unidimensionali della densità dei tessuti, ottenute in sezioni virtuali ogni 0,5 mm. I diversi livelli di densità, colorati convenzionalmente, danno indicazioni sulla qualità del materiale sottoposto ad analisi. Una serie di sezioni unidimensionali possono essere elaborate per ottenere immagini tridimensionali.

Topofisi

Fenomeno per cui le gemme, i germogli o le talee mantengono per un lasso di tempo variabile la forma e la fase vegetativa che avevano sulla pianta da cui è stato effettuato il prelievo.

Torba

Materiale estratto da depositi organici costituiti da resti di vegetali attuali o recenti al primo stadio di carbonizzazione, largamente usato nel vivaismo per la preparazione di terricci.

Trattamento del seme

Spesso impiegato come sinonimo di pretrattamento del seme (vedi).

TTC

Vedi Tetrazolio.

Tubercolo

Piccola prominenza rotondeggiante sulla superficie di vari organi (es.: frutti, semi, radici, etc.)

Tubero

Organo di riserva delle piante costituito da un fusto od un ramo sotterraneo con un forte ingrossamento a livello del midollo. E' un tubero per esempio la patata. Dicesi tuberizzata anche una radice che presenti le stesse caratteristiche del tubero.

Umidità relativa

Espressa in percentuale è definita come il rapporto tra il peso del vapore d'acqua contenuto in un Kg di materia e il peso del vapore d'acqua contenuto in un Kg di materia satura ad una data temperatura.

Unisessuale

Un fiore con organi solo maschili o solo femminili, e cioè che reca, rispettivamente, solo gli stami o i pistilli.

Unità tassonomica

Entità gerarchica del mondo vivente che comprende individui tra loro più o meno affini secondo certi criteri di classificazione. Sinonimo di *taxon*.

Validazione dei protocolli

Conferma sperimentale dei risultati ottenuti attraverso l'applicazione di protocolli di germinazione individuati mediante sperimentazione o elaborati da altre istituzioni.

Variabilità genetica

Presenza in una specie di differenti forme dello/gli stesso/i carattere/i. In natura, grazie anche al continuo ricombinarsi dell'informazione genetica nelle diverse generazioni, permette alla specie di adattarsi alle variazioni ambientali; l'uomo la può usare per la selezione dei caratteri più utili.

Varietà

Per molte specie forestali si tratta semplicemente di cloni o cultivar, come ad esempio si è verificato per il castagno o per le varietà innestate di noce.

a. Cultivar: termine agronomico per indicare una popolazione di cloni o sementali definita con nomi o sigle non latini a scopo eminentemente pratico. Per le piante forestali, pur trattandosi dello stesso materiale dal punto di vista genetico, il nome può cambiare da località a località.

b. Varietà tassonomica: si tratta di entità di rango varietale, di solito tipica di aree geografiche e distinguibile per alcuni caratteri, identificata ufficialmente con nomi latini dalla nomenclatura botanica internazionale.

Vernalizzazione

Processo per cui un periodo di basse temperature promuove un fenomeno biologico (es.: fioritura, apertura delle gemme, germinazione dei semi) che altrimenti non avverrebbe. Nel caso dei semi, il termine è sinonimo di stratificazione fredda e di *chilling*.

Vigore (del seme)

La somma totale di quelle proprietà del seme, che determinano il livello di attività e di performance durante la germinazione e l'emergenza. Non basta un solo test per determinare il vigore di un campione.

Viraggio

Cambiamento di colore.

Vitalità

Capacità di un organo di svolgere le funzioni cui è destinato attraverso una serie di attività metaboliche indirizzate allo scopo. Può trattarsi di polline, radici, colture meristematiche, semi. La vitalità si misura attraverso test chimici o fisici di vario tipo che misurano essenzialmente la funzionalità delle cellule dell'organo. I test di vitalità sono più rapidi rispetto a quelli classici (es.: di germinazione), ma possono fornire stime differenti. Un seme si definisce vitale quando presenta tutte quelle caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche essenziali alla sua germinazione. Un seme può essere vitale ma incapace di germinare se è soggetto a qualche tipo di dormienza.

Warming

Vedi Stratificazione calda.

Xerofita

Pianta che si adatta con facilità o addirittura predilige luoghi aridi e siccitosi.

Zigote

La cellula diploide che deriva dall'unione di due gameti in seguito alla fecondazione.

Zoocoria

Processo di dispersione di semi e frutti determinato dagli animali.

12. INDIRIZZI UTILI

12.1 Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea italiana (RIBES)

Banca del Germoplasma CODRA Mediterranea S. r. l.
CODRA Mediterranea S. r. l.
Centro operativo per la difesa e il recupero ambientale
C. da Sciffra
85010 Pignola (PZ)

Banca del germoplasma del CNR di Bari
Istituto di Genetica Vegetale IGV,
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via G. Amendola, 165/ A
70126 Bari (BA)

Banca del germoplasma del Molise
Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Ambiente e del Territorio
Università degli Studi del Molise
Via Mazzini, 8
86170 Isernia

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Catania
Dipartimento di Botanica
Università degli Studi di Catania
Via A. Longo, 19
95125 Catania (CT)

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Padova
Centro di Ateneo Orto Botanico
Università degli Studi di Padova
Via Orto Botanico, 15
35123 Padova (PD)

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Palermo
Dipartimento di Scienze Botaniche
Università degli Studi di Palermo
Via Archirafi, 38
90123 Palermo (PA)

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Pisa
Orto Botanico, Dipartimento di Scienze Botaniche,
Università degli Studi di Pisa
Via Luca Ghini, 5
56126 Pisa (PI)

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Roma
Orto Botanico, Dipartimento di Biologia Vegetale
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
Via Cristina di Svezia, 24
00165 Roma

Banca del germoplasma dell'Orto Botanico di Viterbo
Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico
Università degli Studi della Tuscia
Strada Santa Caterina s. n. c.,
01100 Viterbo (VT)

Banca del germoplasma della Majella
Parco Nazionale della Majella,
67030 Campo di Giove (AQ)

Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR)
Centro Conservazione Biodiversità (CCB)
Dipartimento di Scienze Botaniche
Università degli Studi di Cagliari
Viale Sant'Ignazio da Laconi, 13
09123 Cagliari (CA)

Banca del Germoplasma dell'Appennino Centrale
Centro Ricerche Floristiche dell'Appennino (C. R. F. A.)
c/o Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga
S. Colombo - via prov. le km 4,2
67021 Barisciano (AQ)

Banca del germoplasma delle Alpi Sud-Occidentali
CBV – Centro per la Biodiversità Vegetale
Ente Gestione Parchi e Riserve Naturali Cuneesi
Via Santa Anna, 34
12013 Chiusa Pesio (CN)

Banca del germoplasma per la conservazione delle specie anfiadriatiche
Centro Orto Botanico Interdipartimentale di Servizi
Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche s. n.
60131 Ancona (AN)

Banca di germoplasma del Mediterraneo ®, ONLUS
Via Pietro Floridia, 2
90129 Palermo (PA)

Banche del Germoplasma Livornesi
Museo di Storia Naturale del Mediterraneo e Conservatorio
delle specie vegetali di Rosignano
c/o Provincia di Livorno,
P. zza del Municipio 4
57128 Livorno (LI)

Laboratorio per la conservazione della diversità vegetale ligure
Centro universitario di Servizi Giardini Botanici Hanbury
Università degli Studi di Genova
Corso Montecarlo, 43, La Mortola
18039 Ventimiglia (IM)

Lombardy Seed Bank LSB
c/o Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri
Università degli Studi di Pavia
Via S. Epifanio, 14
27100 Pavia (PV)

Trentino Seed Bank TSB
Museo tridentino di scienze naturali
Via Calepina, 14
38100 Trento (TN)

12.2 Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN)

Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français
Keramenez
29470 Plougastel-Daoulas (France)

Conservatoire Botanique National Alpin
Domaine de Charance
05000 Gap (France)

Conservatoire Botanique National de Bailleul
Hameau de Haendries
59270 Bailleul (France)

Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien
61, rue Buffon
75005 Paris (France)

Conservatoire Botanique National de Brest
52, allée du Bot
29200 Brest (France)

Conservatoire Botanique National de Mascarin
RD 12, Domaine des Colimaçons
97436 Saint-Leu, Ile de la Réunion (France)

Conservatoire Botanique National du Massif Central
Le Bourg
43230 Chavaniac – Lafayette (France)

Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles
Parc National de Port Cros
Castel Sainte Claire
83418 Hyères cedex (France)

Conservatoire Botanique National de Midi-Pyrénées
Vallon de Salut, BP 315
65203 Bagnères-de-Bigorre cedex (France)

Conservatoire National des plantes médicinales, aromatiques et industrielles
Route de Nemours
91490 Milly-la-Forêt (France)

Conservatoire Botanique de Franche-Comté
Porte Rivotte
25000 BESANCON (France)

Mission Conservatoire Botanique Aquitaine, Poitou/Charentes
Direction de l'Environnement, Conseil Général de la Gironde, Esplanade Charles De Gaulle
33074 Bordeaux cedex (France)

Mission Conservatoire Botanique des Antilles Françaises
Antenne de la Martinique, Parc Floral, BP 4033
97254 Fort-de-France (Antilles Françaises) Antenne de la Guadeloupe

Museum national d'Histoire naturelle
57, rue Cuvier
75005 Paris (France)

12.3 Red Española de Bancos de Germoplasmas de Plantas Silvestres (REDBAG)

Banco de germoplasma del Jardín Botánico de Córdoba
Avda. de Linneo s/n
14004 Córdoba (Spain)

Banc de germoplasma del Jardí Botànic de la Universitat de València
C/ Quart, 80
46008 Valencia (Spain)

Banco de germoplasma del Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo
Apartado de Correos 14 de Tafira Alta
35017 Las Palmas de Gran Canaria (Spain)

Banco de germoplasma del Real Jardín Botánico de Madrid
Plaza de Murillo, 2,
28014 Madrid (Spain)

Banc de llavors del Jardí Botànic Marimurtra
Passeig Carles Faust, 9
Apartat Correus 112
17300 Blanes – Girona (Spain)

Banc de llavors del Jardí Botànic de Sóller
Crta. Palma - Sóller, km. 30,5
Apartado de correos 44.
07100 Sóller (Spain)

Banco de semillas del Real Jardín Botánico Juan Carlos I
Universidad de Alcalá de Henares – Comunidad de Madrid
Ciudad Residencial Universitaria, Bloque A3-p.7. Campus de la Universidad de Alcalá.
28805 Alcalá de Henares (Spain)

12.4 Banche del Germoplasma e Centri per la conservazione internazionali

Seed Conservation Department
Royal Botanic Gardens
Kew, Wakehurst place
RH176TN Ardingly, Haywards Heath (England, UK)

Seed Room, Kirstenbosch NBG
Private Bag X7 CLAREMONT,
Cape Town 7735 (South Africa)

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE
Banco de semillas forestales Turrialba, Costa Rica

Banc de germoplasma del Jardí Botànic de Barcelona
C/ Dr. Font i Quer, 2. Parc de Montjuic.
08038 Barcelona (Spain)

Banc de llavors forestals – Generalitat Valenciana
Avda. Comarques del País Valencià, 114
46930 Quart de Poblet (Spain)

Centro Nacional de Mejora Forestal El Serranillo
Dirección General para la Biodiversidad - Ministerio de Medio Ambiente
Ctra. de Fontanar, Km.2 Apdo. de Correos, 249
19080 Guadalajara (Spain)

National Center for Genetic Resources Preservation
Department of Agriculture, Agriculture Research Services.
1111 South Mason
Fort Collins, Colorado 80521-4500 (USA)

Institut des Régions Arides
Laboratoire d'Ecologie Pastorale
4119 Médenine (Tunisie)

Instituto Universitario de Investigación CIBIO
(Centro Iberoamericano de la Biodiversidad)
Universidad de Alicante
30008 Alicante (Spain)

Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICh)
Adresse: B.P. 85
73100 Chania – Crete (Grece)

12.5 Siti web

<http://www.apat.it>
APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici

<http://www.ars.usda.gov/is/AR/>
Agricultural Research Service

<http://www.aosaseed.com>
Association of Seed Analysts (AOSA)

<http://www.agraria.org/coltivazioniforestali.htm>
Atlante delle piante forestali

<http://www.anbg.gov.au/anpc/>
Australian Network for Plant Conservation

<http://www.tufts.edu/~cchester/biodiversity.html>

Biodiversity links

<http://digilander.libero.it/alberiitaliani/boschi.htm>

Boschi italiani

<http://www.bgci.org.uk/>

Botanic Gardens Conservation International (BGCI)

<http://www.rbg.ca/cbcn/>

Canadian Botanical Conservation Network

<http://www.centerforplantconservation.org/>

Center for Plant Conservation

<http://www.ccb-sardegna.it>

Centro Conservazione Biodiversità – Università di Cagliari

<http://www.lib.berkeley.edu/EART/vegmaps.html>

Checklist of online vegetation and plant distribution maps

<http://www.compagniadelleforeste.it/>

Compagnia delle Foreste

<http://www.portcrosparcnational.fr/conservatoire/>

Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles

<http://www.cbn-alpin.org>

Conservatoire Botanique National Alpin de Gap-Charance

<http://www.cbnbrest.fr/>

Conservatoire Botanique National de Brest

http://inpn.mnhn.fr/cbnbp_new/

Conservatoire Botanique National Bassin Parisien

<http://www.cbnbl.org/>

Conservatoire Botanique National de Bailleul

<http://www.corpoforestale.it/wai/serviziattivita/CITES/index.html>

Convenzione di Washington C.I.T.E.S.

<http://www.corpoforestale.it/wai/index.html>

Corpo Forestale dello Stato

<http://www.dfsc.dk/>

Danida Forest Seed Centre

<http://botit.botany.wisc.edu/images/veg/>
Distribuzione di piante in base all'habitat

<http://www.bioplatform.info/>
European Platform for Biodiversity

<http://www.ecnc.nl/doc/ecnc/saxifrag/euroflor.html>
European Centre for Nature Conservation

<http://www.fs.fed.us/database/feis/>
Fire Effect Information System

<http://www.fao.org>
Food and agriculture organization of the United Nations

<http://forests.org/links/>
Forest Conservation Links

<http://www.forestsscience.info>
Forest Science Database

<http://germoplasma.arsia.toscana.it/Germo/home.htm>
Il germoplasma della Toscana

<http://www.cibio.org>
Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad). Universidad de Alicante (España)

<http://www.itis.usda.gov>
Integrated Taxonomic Information System

<http://www.ippc.int>
International Phytosanitary Portal (IPP): the official web site for the International Plant Protection Convention (IPPC)

<http://www.ipgri.org>
International Plant Genetic Resources Institute

<http://www.ipni.org/index.html>
International Plant Names Index

<http://seedtest.org/en/home.html>
International Seed Testing Association (ISTA)

<http://www.usd.edu/iss/>

International Society for Seed Science

<http://www.iucn.org/>

International Union for the Conservation of Nature (IUCN)

<http://www.botany.net/IDB/botany.html>

Internet Directory for Botany

<http://www.jardibotanic.pcn.es>

Jardí Botànic de Barcelona - Spain

<http://www.step.es/jardcan/>

Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo - Spain

<http://www.jardinbotanicodecordoba.com/>

Jardín Botánico de Córdoba - Spain

<http://www.jardibotanicdesoller.org>

Jardí Botànic de Sóller – Spain

<http://www.jardibotanic.org>

Jardí Botànic de la Universitat de València - Spain

<http://www.jbotanicmarimurtra.org>

Jardí Botànic Marimurtra - Spain

<http://www.forgen.net/main/bds.asp>

Libro nazionale dei boschi da seme

<http://www.ecologie.gouv.fr>

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable

<http://www.mnhn.fr>

Museum national d'Histoire naturelle

<http://www.nsl.fs.fed.us>

National Seed Laboratory (USA)

<http://www.nativeseeds.org/>

Native Seed/SEARCH – USA

<http://www.atl.cfs.nrcan.gc.ca/seedcentre/seed-center-e.htm>

National Tree Seed Centre (Canada)

<http://www.nativeplantnetwork.org/network/general.asp>

Native Plants Propagation Protocol Database

<http://www.nature.nps.gov/biology/endangeredspecies/>

Natural Parks Service, Endangered Species

<http://www.cof.orst.edu/coops/ntc/ntc.htm>

Nursery Technology Cooperative

<http://plants.usda.gov/>

Plants database, USDA Natural Resources Conservation Service

<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/>

Plant Species Life Form

http://www.ricercaforestale.it/riselvitalia/BIODIVERSITA/Riselvitalia1.1/sottoprogetto_1.1.htm

Progetto Riselvitalia, produzione materiale forestale di propagazione

<http://www.rjbalcala.com>

Real Jardín Botánico Juan Carlos I - Spain

<http://www.rjb.csic.es>

Real Jardín Botánico de Madrid – Spain

<http://www.rngr.net/>

Reforestation, Nursery and Genetic Resources

<http://www.reteortibotanicilombardia.it/>

Rete degli Orti Botanici della Lombardia

<http://www.rbgekew.org.uk>

Royal Botanic Gardens, Kew

<http://www.rbgekew.org.uk/data/sid>

Royal Botanic Gardens, Seed information Database

<http://www.sanbi.org/products/seeds.htm>

Seed Room, Kirstenbosch National Botanical Garden

<http://www.genmedoc.org/>

Sito ufficiale del Progetto Interreg III B “Genmedoc”: Création d’un réseau d’un centre de conservation du matériel génétique de la flore des régions méditerranéennes de l’espace MEDOCC

<http://www.granicoltura.it>

Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia

<http://www.ensconet.com>

The “European Native Seed COnservation NETwork”

<http://www.nerium.net/plantaeuropa/main.htm>

The Global Strategy for Plant Conservation in Europe

<http://www.rngr.net/Publications/ttsm>

Tropical Tree Seed Manual

<http://www.seedcentre.nl/>

Wageningen Seed Centre

<http://www.calflora.org/index0.html>

Wild Plants in California

<http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/>

Woody Plant Seed Manual

<http://stort.unep-wcmc.org/imaps/gb2002/book/viewer.htm>

World Atlas of Biodiversity

<http://www.populus.it/xilo.php>

XILOGLOS - Glossario multilingue dei termini utilizzati in tecnologia del legno

<http://redlist.org>

2003 IUCN Red List of Threatened Species

12.6 Riviste scientifiche specializzate

Crop Science

The Crop Science Society of America, Inc. Madison, WI. USA

<http://crop.scijournals.org/>

Journal of New Seeds

The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. USA

<http://www.haworthpress.com/>

Native Plants Journal

USDA Forest Service, SRS

1221 South Main Street

Moscow, Idaho 83843–4211, USA

<http://www.nativeplantnetwork.org/journal/>

Plant Physiology

<http://www.plantphysiol.org>

Seed Abstracts

CAB International, Wallingford, UK

<http://www.cabi-publishing.org/>

Seed Info

Official Newsletter of the WANA Seed Network, ICARDA, Aleppo, Syria

<http://www.icarda.cgiar.org>

Seed Science and Technology

Proceedings of the International Seed Testing Association (ISTA)

<http://www.seedtest.org>

Seed Science Research

CAB International, Wallingford, UK

<http://www.cabi-publishing.org/>

<http://hort.cabweb.org/>

Seed Technology

Association of Seed Analysts, INC (AOSA). Las Cruces, NM. USA

<http://www.aosaseed.com/>

Seed Testing International

ISTA News Bulletin

<http://www.seedtest.org>

Semillero América Latina

Bollettino elettronico mensile pubblicato da New Forests Project, Washington DC 20003 USA

<http://www.newforestsproject.com>

Cryobiology

Society for Cryobiology

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622814/description#description

Cryoletters

The Royal Veterinary College, Royal College Street, London NW1 0TU, UK

<http://www.cryoletters.org/>

13. SCHEDE ALLEGATE

Per l'elaborazione delle schede allegate al volume sono state consultate le seguenti opere di riferimento: Albert *et al.* 2003; Badescu, 1997; Brullo *et al.*, 1996; Braun-Blanquet, 1951; CORINE, 1993; Flynn *et al.*, 2004; Gardin *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 1998; IPGRI, 1982 e 1985a; ISTA, 2006; Marion *et George*, 2001; Martin, 1946; Martin *et Barkley*, 1961; Mossa *et al.*, 2004; Pinna, 1977; Pignatti, 1982; Pignatti, 1995; Raunkiaer, 1934; Rivas-Martínez *et al.*, 2002; Royal Botanic Gardens Kew; Soil Survey Staff - USDA, 1998; Thomsen *et Kiklev*, 2000; Ubaldi, 2003; Zangheri, 1942.

13.1 Raccolta del germoplasma

SCHEDA RACCOLTA GERMOPLASMA		ID progressivo:	Data ingresso:
N.	Taxon:		Operatore:
Flora utilizzata per la determinazione:		Dati popolazionali:	
Nome raccogliatore/codice:		Codice Popolazione:	
Ente di appartenenza/codice:		Stato: Regione: Provincia:	
Progetto:		Comune:	
Proprietà del materiale:		Località:	
Finalità della raccolta:		Proprietà:	
☐ Banca del germoplasma ____ % ☐ Semina ____ % ☐ Altro: ____ % Specificare _____		Cartografia: " Y () ° ' "	
Data e ora di raccolta:		Strumento utilizzato:	
Temp. (T°C): Umidità Relativa (%): P. atmosferica (hPa-mbar)		Grado di precisione:	
Condizioni meteo:		Alt.: media (min max)	
		Inclinaz.: media (min max)	
		Esposiz.: media (da a)	
		Litologia:	
		Rocciosità (%):	
		Pietrosità (%):	
		Classif. pedologica:	
		Orizzonti:	
		Drenaggio: 1 2 3 4 5	
		Camp. pH: ____	
		Coerenza: 1 2 3 4 5	
		Bioclima:	
		Termotipo:	
		Ombrotipo:	
		Tipo di vegetazione:	
		Codice Corine:	
		Codice Habitat:	
		Codice SIC:	
Metodo di campionamento:		Area campionata mq: Area popolazione mq:	
☐ Regolarmente distribuito sulla stazione ☐ Al centro della stazione ☐ Lungo una linea trasversale ☐ Lungo una linea di margine ☐ Altro:		Macropopolazione ☐ Dimensioni (mq):	
		N. Micropopolazioni ☐ Scheda Rilievo Demografico: Si No	
		Struttura della popolazione:	
		☐ individui isolati (1) ☐ piccoli gruppi (2) ☐ gruppi (3) ☐ colonie (4) ☐ popolamento (5)	
		Rif. Cartografia: Si No	
		N. lotti/buste riferite a questa scheda:	
N. individui presenti:			
1-5! 6-10! 11-50! 51-100! 101-250! 251-500! 501-1000! 1001-2500! 2501-5000! 5001-10000! >10000!			
Materiale prelevato:		Stadio fenologico prevalente	
☐ Semi ☐ Bulbilli ☐ Frutti ☐ Bulbi ☐ Polline ☐ Rizomi ☐ Sporo ☐ Tuberi ☐ Talee ☐ Altro:		☐ 000 senza fiori ☐ +00 con soli fiori in boccio ☐ ++0 con fiori in boccio e in antesi ☐ +++ con fiori in boccio, antesi e appassiti ☐ 0++ con fiori in antesi ed appassiti ☐ 00+ con solo fiori appassiti ☐ 00+b con fiori appassiti e bacche acerbe ☐ 00+fr con fiori appassiti e frutti immaturi ☐ 000b con bacche mature ☐ 000fr con frutti maturi ☐ 000sd semi dispersi ☐ altro.	
N. di semi per frutto:		% piante:	
N. di semi per individuo:		% piante giovani:	
N. di semi raccolti per individuo:		% piante adulte:	
N. individui sui quali è stata effettuata la raccolta:		% piante morte:	
% di popolazione produttore semi:		causa:	
Raccolta da: Pianta ☐ Suolo ☐		Infiorescenza o fiori con:	
Stato dei semi: Umidri ☐ Asciutti ☐ Altro:		fioritura simultanea ☐	
N. semi prova del taglio: % esito positivo:		fioritura scaglionata ☐	
Dati morfometrici:		☐ centripeta ☐ centrifuga ☐ basale ☐ apicale	
Disseminazione:		Tipo di materiale raccolto:	
Autocora ☐ Barocora ☐ Anemocora ☐ Zoocora ☐ Idrocora ☐ Balistocora ☐ Policora ☐ Altro ☐		Campione erbario: Si ☐ No ☐	
Protezione legale:		Pianta in vaso: Si ☐ No ☐	
Stato e misure di conservazione Attuali Potenziali		Frutti test preliminari: Si ☐ No ☐	
Condizioni fitosanitarie popolazione: 1 2 3 4 5		Mat. biologia molec.: Si ☐ No ☐	
Stato conservazione popolazione: 1 2 3 4 5		Mat. cariologia: Si ☐ No ☐	
Rischi e fattori di minaccia: Attuali Potenziali		Banca semi del suolo: Si ☐ No ☐	
Pre-trattamenti:		Altro:	
Note:			
☐ Mancata raccolta ☐ Necessaria nuova raccolta ☐ Necessaria rigenerazione per determinazione			

13.2 Rilievo fenologico

SCHEDA RILEVAMENTO FENOLOGICO		ID progressivo:	Data ingresso:
N.	Taxon:		Operatore:
Rilevatore:		Data:	
		N. giorno calendario fenologico:	
Dati popolazionali ed ecologici: Codice Popolazione: _____ Stato: _____ Regione: _____ Provincia: _____ Comune: _____ Località: _____ Foglio IGM: _____ N. _____ E. _____ Strumento utilizzato: _____ Precisione del dato: _____ Alt.: media (min max) Inclinaz.: media (min max) Esposiz.: media (da a) Litologia: _____ Rocciosità (%) : _____ Pietrosità (%) : _____ Classif. pedologica: _____ Orizzonti: _____ ! Camp. pH: _____ Drenaggio: 1 2 3 4 5 Coerenza: 1 2 3 4 5 Bioclima: _____ Ombrotipo: _____ Termotipo: _____ Tipo di vegetazione: _____ Codice Corine: _____ Codice Habitat: _____ Tipo corologico: _____			
DATI BIOLOGICI			
Forma _____ Sottoforma _____		☐ Monocarpica ☐ Pluricarpica	
☐ Caducifolia ☐ Semicaducifolia ☐ Sempreverde		Stasi del ciclo vegetativo ☐ INO ☐ ISI Durata _____	
FASE VEGETATIVA			
Germie ☐ Assenti ☐ Presenti ☐ Abbozzate ☐ Poco sviluppate ☐ Completamente formate Colore _____ Forma _____ Larghezza _____ Lunghezza _____ Struttura/Disegno _____			
Germogli ☐ Assenti ☐ Presenti ☐ scarsi ☐ poco numerosi ☐ numerosi Altezza media _____ Altezza min _____ Altezza max _____			
Foglie ☐ Assenti ☐ Presenti ☐ immature ☐ mature ☐ senescenti			
FIORITURA			
% individui fioriti _____ ☐ Assente ☐ Presente ☐ simultanea ☐ scaglionata ☐ centripeta ☐ centrifuga ☐ basale ☐ apicale Scapi fiorali ☐ Assenti ☐ Presenti ☐ sterili ☐ fertili % _____ +00 solo fiori in boccio % _____ ++0 fiori in boccio e in antesi % _____ +++ fiori in boccio, in antesi ed appassiti % _____ 0++ fiori in antesi ed appassiti % _____ 00+ solo fiori appassiti			
FRUTTIFICAZIONE			
☐ Assente ☐ Presente ☐ frutti immaturi _____ % ☐ frutti maturi _____ % ☐ frutti deiscenti _____ % ☐ fiori e frutti contemporanei ☐ semi assenti ☐ semi presenti ☐ vuoti ☐ pieni Disseminazione: ☐ Autocora ☐ Barocora ☐ Anemocora ☐ Zoocora ☐ Idrocora ☐ Balistocora ☐ Policora ☐ Altro: _____			
Fattori biotici e abiotici di disturbo/minaccia:			
NOTE			

13.3 Rilievo demografico

[illegible]

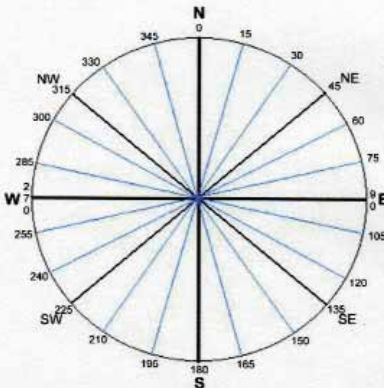
— 212

[illegible]

13.5 Studio della fauna associata

[illegible]

13.6 Studio meteo-climatico

SCHEDA METEO-CLIMATICA		ID progressivo:		Data ingresso:	
N.	Taxon:			Operatore:	
Rilevatore:				Data:	
Dati popolazionali: Codice Popolazione: _____ Stato: _____ Regione: _____ Provincia: _____ Comune: _____ Località: _____ Foglio IGM: _____ N _____ ° _____ ' _____ " E _____ ° _____ ' _____ "					
Strumento utilizzato: _____ Precisione del dato: _____ Alt.: media _____ (min _____ max _____) Inclinaz.: media _____ (min _____ max _____) Esposiz.: media _____ (da _____ a _____) Litologia: _____ Rocciosità (%) : _____ Pietrosità (%) : _____ Classif. pedologica: _____ Orizzonti: _____ !__! Camp.pH: _____ Drenaggio: 1 2 3 4 5 Coerenza: 1 2 3 4 5 Bioclima: _____ Termotipo: _____ Ombrotipo: _____ Tipo di vegetazione: _____ Codice Corine: _____ Codice Habitat: _____					
Calcolo dell'insolazione relativa Area rilevata (mq) _____ Altezza delle misurazioni dal suolo (m) _____ Altezza media vegetazione (m) _____ Osservazioni: _____			Calcolo del cono d'ombra 		
Temperatura (°C)		Pressione atmosferica (hPa - mbar)		Umidità relativa (%)	
Ventosità Direzione prevalente _____ Velocità media _____					
Condizioni meteo					
Disponibilità di acqua meteorica in superficie Quantità: _____ !__! Ghiaccio cm: _____ !__! Grandine cm: _____ !__! Brina cm: _____ !__! Neve cm: _____ !__! Rugiada cm: _____ !__! Acqua meteorica cm: _____			Stato igroscopico degli orizzonti superficiali del suolo !__! Bagnato !__! Umido !__! Asciutto !__! Secco Note: _____		

13.7 Rilievo pedologico

SCHEDA PEDOLOGICA		ID progressivo:		Data ingresso:	
N.	Taxon:			Operatore:	
Rilevatore:				Data:	
Dati popolazionali: Codice Popolazione: _____ Stato: _____ Regione: _____ Provincia: _____ Comune: _____ Località: _____ Foglio IGM: _____ N. _____ E. _____ Strumento utilizzato: _____ Precisione del dato: _____ Alt.: media (min max) Inclinaz.: media (min max) Esposiz.: media (da a) Litologia: _____ Rocciosità (%) : _____ Pietrosità (%) : _____ Drenaggio: 1 2 3 4 5 Coerenza: 1 2 3 4 5 Bioclina: _____ Ombrotipo: _____ Tipo di vegetazione: _____ Codice Corine: _____ Codice Habitat: _____					

QUALITA' DEL SUOLO PROFONDITA' FALDA _____ SCORRIMENTO SUPERFICIALE _____ PROFONDITA' UTILE _____ DRENAGGIO INTERNO _____	PIETROSITA' diam. <7,5 cm: _____ diam. 7,5-25 cm: _____ diam. >25 cm: _____ FESSURE lunghez.: _____ larghez.: _____ profond.: _____	SCHEMA DEL PAESAGGIO:
--	--	--

NUM. ORIZZONTE	CODICE ORIZZONTE	LIMITI				UMIDITA'	COLORE DELLA MATRICE	Figura oss. rid. e scritte				PELLICOLE		CONCENTRAZIONI		SCHELETRO				FACCE PR/SC			
		SUPERIORE	INTERIORE	TIPO	ANDAMENTO			COLORE	ABBONDANZA %	DIMENSIONI mm	EVIDENZA	LOCALIZZAZIONE	ABBONDANZA	SPESORE mm	LOCALIZZAZIONE	NATURA E COMPOSIZIONE	ABBONDANZA %	DIMENSIONI mm	ABBONDANZA %	DIMENSIONI mm	FORMA	LITOLOGIA	ALTERAZIONE
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							

NUM. ORIZZONTE	CONSIST.				STRUTTURA		PORI		FESS.		RADICI		ATT. BIOL.		CAMP.		NOTE			
	SUOLO UMIDO	SUOLO SECCO	ADESIVITA'	PLASTICITA'	FORMA	DIMENSIONI mm	GRADO DI AGGREGAZIONE	ABBONDANZA %	DIMENSIONI mm	QUANTITA'	DIMENSIONI mm	DIMENSIONI mm	QUANTITA'	ANDAMENTO	TIPO	QUANTITA'		EFFERVESCENZA HCI	LOCALIZZAZIONE BPF.	ANALISI ROUTINE
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				

NOTE

13.8 Test iniziali

SCHEDA TEST INIZIALI		ID progressivo:	Data ingresso:
N.	Taxon	Operatore:	

Data	Precisione della pesata
Numero totale frutti	Peso fresco dell'accessione g
Stato dei frutti	Tipo di frutto achenio

PESO DEI FRUTTI			
	X: Replica (n° frutti)	A: Peso tot (g)	B: Peso medio dei frutti per replica
1			
2			
3			
4			
Peso medio dei frutti			
Numero di frutti per Kg			
Note			

VOLUME DEI FRUTTI		
	A: Replica (n° frutti in 100 ml)	B: n° frutti per litro
1		
2		
3		
4		
Volume dei frutti		
Procedura		
Note		

SEMI PER FRUTTO					
	X: Replica (n° frutti)	A: n° frutti vuoti	B: n° di semi	C: n° medio di semi per frutto	Note
1					
2					
3					
4					
N° medio di semi per frutto					
N° di semi per Kg di frutti					
Percentuale di frutti vuoti					

PESO FRESCO DEI SEMI			
	X: Replica (n° semi)	A: Peso tot (g)	B: Peso medio dei semi per replica
1			
2			
3			
4			
Peso fresco medio dei semi			
Note			

Osservazioni

Responsabile:

13.9 Pulizia e conservazione del germoplasma - A

PAGINA 1

Pulizia e conservazione del germoplasma - B

OSSERVAZIONI DEL CAMPIONE:		
Tegumenti		
Endosperma		
Embrione		
Cotiledoni		
TEST ESEGUITI:		
CODICE	DATA	RISULTATI E OSSERVAZIONI
FOTO		

13.10 Monitoraggio della deidratazione

SCHEDA MONITORAGGIO DEIDRATAZIONE		ID progressivo:	Data ingresso:	Operatore:
N°	Taxon	Localizzazione		
Data iniziale		Data finale		

CALCOLO DEL CONTENUTO IDRICO INIZIALE

Data Contenuto in olii

Metodo

- X peso dei semi freschi in g
- A peso del pesafiltri (tara) in g
- B peso dei semi freschi + peso del pesafiltri in g
- C peso dei semi disidratati + peso del pesafiltri in g
- D mc % sul peso fresco iniziale dei semi.
- E Calcolo automatico mc% aw%
- F Tempo (min)

	X	A	B	C	D	E	F
1							
2							
3							
4(n)							
	mc % medio dei semi						

CALCOLO DEL PESO TARGET

mc iniziale	%	PESO INIZIALE	g
mc finale	%	PESO TARGET	g

MONITORAGGIO DEL PESO

Data	Peso (g)	mc%	aw%	T (°C)	u. r. (%)

Andamento della deidratazione

CONTEGGIO INIZIALE

N semi	Peso	Peso/N semi
Peso medio seme		
Peso totale accensione		
Numero semi		

CONTEGGIO FINALE

N semi	Peso	Peso/N semi
Peso medio seme deidratato		
Peso totale accensione		
Numero semi		

NOTE

13.11 Test di germinazione - A

PAGINA 1

Test di germinazione - B

[illegible]

13.12 Test colorimetrico

SCHEDA TEST COLORIMETRICO (TTC)		ID progressivo:	Data ingresso:	Operatore:
N.	Taxon			
Codice di rif. test di germinazione:		Data iniziale e finale della prova: dal ____/____/____ al ____/____/____		
Preparazione al test:				
Provenienza dei semi:				
Repliche				
N. semi per replica (n):				
Concentrazione (%):				
Temperatura (°C):				
Tempo (min):				
Tipo di taglio:				
Osservazioni				
Asse embrionale				
Colledoni				
Endosperma				
Tegumenti				
% semi vitali				
Valutazione:				
Note:				
Responsabile:				

223

13.14 Gestione della semina

[illegible]

14. BIBLIOGRAFIA

- ALBERT M.J., BAÑARES Á., DE LA CRUZ M., DOMÍNGUEZ F., ESCUDERO A., IRIONDO J.M., GARCÍA M.B., GUZMÁN D., MARRERO M., MORENO J.C., SAINZ H., TAPIA F., TORRES E., 2003 - Manual de Metodología de Trabajo Corológico y Demográfico. Versión 4.2 In: BAÑARES Á., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C., ORTIZ S., (eds.), 2003 – Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- ARONNE G., WILCOCK C.C., 1994 - First evidence of myrmecochory in fleshy – fruited shrubs of the mediterranean region. *New Phytol.*, 127: 781-788.
- ARRIGONI O., 1974 - Elementi di biologia vegetale. CEA, Milano.
- ATICI Ö., NALBANTOGLU B., 2003 - Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64: 1187-1196.
- BACCHETTA G., 2006 – Conservare la natura. In: TAFFETANI F. (ed.), 2006 – Manuale sugli erbari. Edagricole, Bologna, in press.
- BADESCU V., 1997 - Verification of some very simple clear and cloudy sky models to evaluate global solar irradiance. *Solar Energy*, 61(4): 251-264.
- BAÑARES A., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C., ORTIZ S., 2003 - Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España: táxones prioritarios. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- BARNABAS B., RAJKI E., 1981 - Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.*, 48: 861-864.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 1998 – Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, USA.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 2003 - When breaking dormancy is a problem. Try a move-along experiment. *Native Plants Journal*, 4(1): 17-21.
- BEATTIE A.J., LYONS N., 1975 - Seed dispersal in *Viola* (*Violaceae*): adaptations and strategies. *Am. J. Bot.*, 62: 714-722.
- BEDINI G., ROSSI G., BONOMI C., 2005 – RIBES, la Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea. *Inform. Bot. Ital.*, 37(1 parte a): 114-115.
- BEGON M., HARPER J.L., TOWNSEND C.R., 1989 – Ecologia: individui, popolazioni, comunità. Zanichelli, Bologna.
- BENSON E.E., 1999 - Cryopreservation. In: BENSON E.E. (ed.), 1999 - Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, Ltd, London.
- BENSON E.E., KRISHNAPILLAY B., MARZALINA M., 1996 - The potential of biotechnology in the in vitro conservation of Malaysian forest germplasm: an integrated approach. In: NORHARA H., BACON P.S., KHOO K.C. (eds.), 1996 - Proceedings of the 3rd conference on Forestry and Forest Products Research, FRIM, 1: 76-90.
- BERJAK P., PAMMENTER N.W., 2002 – Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO (ed.), 2002 Tropical tree seed manual. USDA Forest Service. Agriculture Handbook.
- BERJAK P., WALKER M., MYCOCK D.J., WESLEY-SMITH J., WATT M.P., PAMMENTER N.W., 2000 - Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN F., TAKAGI H. (eds.), 2000 - Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. IPGRI, Rome.
- BESNIER F., 1989 - Semillas, Biología y Tecnología. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- BIANCHINI M., PACINI E., 1996 - The caruncle of *Ricinus communis* L. (castor bean): its development and role in seed dehydration, rehydration and germination. *Int. J. Plant Sci.*, 40: 40-48.

-
- BISOFFI S., CAGELLI L., VIETTO L., 1999 - Risorse genetiche di pioppo per la conservazione e il miglioramento genetico. Atti Workshop S.I.S.E.F. 'Analisi e conservazione delle risorse genetiche forestali italiane', Roma 14 Dicembre 1998.
- BLACK M., PRITCHARD H.W. (eds.), 2002 - Dessication and survival in plants, drying without dying. CABI Publishing, Oxon, UK.
- BRAUN-BLANQUET J., 1951 - Pflanzensoziologie. Grundzüge der vegetationskunde. Springer-Verlag, Wien.
- BREWBACHER J.L., KWACK B.H., 1963 - The essential role of Calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot., 50: 859-864.
- BROWN A.H.D., MARSHALL D.R., 1995 - A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- BRULLO S., GRILLO M., GUGLIELMO A., 1996 - Considerazioni fitogeografiche sulla Flora Iblea. Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat., 29: 45-111.
- BULGARINI F., ARDUINO S., TEOFILI C., 2003 - ERC (Ecoregional Conservation) Il processo di Conservazione Ecoregionale e la sua applicazione in Italia. WWF Italia, Roma.
- BURGARELLA C., LORA GONZALEZ A., FICI S., 2004 - Conservation of genetic diversity in artificially regenerated holm oak (*Quercus ilex* L.) populations. In: Proceedings of the 4th European Conference on the Conservation of Wild Plants: A workshop on the implementation of the Global Strategy for Plant Conservation in Europe. Valencia (Spain) 17-20th September 2004.
- CAGELLI L., 1997 - Guidelines for seed and pollen storage. In: TUTOK J., LEFÉVRE F., DE VRIES S., TOTH B. (eds.), 1997 - *Populus nigra* Network Report of the Third *Populus nigra* Network meeting, Sàrvár, Hungary, 5-7 October 1996. IPGRI, Rome.
- CAGELLI L., 1998 - Il Pioppo nero (*Populus nigra* L.). Sherwood - Foreste ed Alberi Oggi, 4-37: 43-47.
- CANULLO R., FALIŃSKA K., 2003 - Ecologia vegetale. La struttura gerarchica della vegetazione. Liguori Editore, Napoli.
- CAPPELLETTI C., 1975 - Botanica, 1. UTET, Torino.
- CASTAGNA R., MONTELEONE I., FERRAZZINI C., CALVO E., BELLETTI P., 2005 - Seme di farnia ad elevato valore genetico. Sherwood, 111: 5-9.
- CERABOLINI B., CERIANI R.M., CACCIANIGA M., DE ANDREIS R., RAIMONDI B., 2003 - Seed size, shape and persistence in soil: a test on Italian flora from Alps to Mediterranean coasts. Seed Sci. Res., 13: 75-85.
- CERCEAU M.T., CHALLE J., 1986 - Biopalynologie and maintenance of germination capacity of stored pollen in some angiosperm families. In: BLACKMERE S., FERGUSON I.K. (eds.), 1986 - Linnean Society Symposium Series, 12: 151-164.
- CERVELLI C. (ed.), 2005 - Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare. Collana Sicilia Foreste n. 26. Regione Siciliana, Agrigento.
- CÔME D., 1970 - Les obstacles à la germination. Masson & CIE, Paris.
- CÔME D., CORBINEAU F., 1992 - Les semences et le froid. In: CÔME D., 1992 - Les végétaux et le froid. Hermann Editeur des sciences et des arts, Paris.
- COMUNITÀ ECONOMICA EUROPEA, 1982. Decisione 82/72/CEE del Consiglio, del 3 dicembre 1981, concernente la conclusione della Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa (Convenzione di Berna). Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee L. 38, 10.02.1982.

-
- COMUNITÀ EUROPEA, 2001. Regolamento (CE) n. 1808/2001 della Commissione del 30.08.2001 recante modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 338/97 del Consiglio, relativo alla protezione di specie della flora e della fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio. Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee L. 250, 19.9.2001.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (eds.), 2005 – An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi Editori, Roma.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 - Libro rosso delle piante d'Italia. Associazione italiana per il World Wildlife Fund, Roma.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 - Liste rosse regionali delle piante d'Italia. Dipartimento di Botanica ed Ecologia, Università degli Studi di Camerino, Camerino.
- COOLBEAR P., GRIERSON D., HEYDECKER W., 1980 – Osmotic pre-sowing treatments and nucleic acid accumulation in tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*). Seed Sci. Technol., 8: 289-303.
- CORINE 1993 - CORINE land cover, technical guide. European Commission, Bruxelles.
- COUR P., LOUBLIER Y., 1980 - Contrôle d'identité et de pureté des lots de pollens destinés à la préparation d'extraits allergéniques à usage diagnostique ou thérapeutique. Rev. Franc. Allergol., 20: 197-201.
- CROSTI R., LADD P.G., DIXON K.W., PIOTTO B., 2006 – Post-fire germination: The effect of smoke on seed of selected species from the central Mediterranean basin. Forest Ecology and Management, 221: 306-312.
- DAFNI A., PACINI E., NEPI M., 2004 - Pollen and stigma biology. In: DAFNI A., KEVAN P. (eds.), 2004 - Methods in Pollination Ecophysiology. Enviroquest, Cambridge, Canada.
- DE LIÑÁN C., 2004 – Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. 20ª edición. Ediciones Agrotécnicas, Madrid.
- DE MONTMOLLIN B., STRAHM W. (eds.), 2005 - The Top 50 Mediterranean Island Plants: Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them. IUCN/SSC Mediterranean Islands Plant Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- DICKIE J.B., PRITCHARD H.W., 2002 – Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. In: BLACK M., PRITCHARD H.W. (eds.), 2002 – Desiccation and survival in plants, drying without dying. CABI Publishing, Oxon, UK.
- DON R., 2003 – ISTA Handbook on seedling evaluation, 3rd Edition. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.
- DUCCI F., 2003 - Criteri ed indirizzi per la raccolta del materiale forestale di propagazione. In: AA.VV., 2003 - Biodiversità e vivaistica forestale – Aspetti normativi, scientifici e tecnici. Manuali e linee guida APAT, 18: 38-48.
- DUCCI F., MALTONI A., TANI A., 2001 - La raccolta del seme di specie forestali. Sherwood, 70: 57-62.
- ELIAS S., GARAY A., SCHWEITZER L., 2006 – Seed quality testing of native species. Native Plants, spring 2006: 15-19.
- ELLIS R.H., 1988 – The viability equation, seed viability nomographs, and practical advice on seed storage. Seed Science and Technology, 16: 29-50.
- ELLIS R.H., ROBERTS E.H., 1980 – Improved equations for the prediction of seed longevity. Annals of Botany, 45: 13-30.
- ELLIS R.H., ROBERTS E.H., 1981 – An investigation into the possible effects of ripeness and repeated threshing on barley seed longevity under six different storage environments. Annals of Botany, 48: 93-96.

-
- ENGELMANN F., 2004 - Plant cryopreservation: Progress and prospects. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40: 427-433.
- EUROPEAN COMMISSION DG ENVIRONMENT Nature and Biodiversity, 2003 – Interpretation Manual of European Union Habitats – EUR25.
- EUROPEAN COMMUNITIES, 1992 - Council Directive 92/43 EEC of 22.7.92. Official Journal of the European Communities, L. 206/7.
- FABRE J., DEREUDDRE J., 1990 - Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo Letters*, 11: 413-426.
- FAGUNDEZ J., IZCO J., 2003 – Seed morphology of *Erica* L. Sect. *Callicodon* Benth. Taxonomic implications. *Plant Biosystems*, 137(1): 111-116.
- FAO, 1995 - Collecting woody perennials. In: GUARINO L., RAMANATHA RAO V., REID R. (eds.), 1995- Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines. CAB International, Wallingford, UK.
- FAO, 2001 - International Standards for Phytosanitary Measures Publication No. 12: Guidelines for phytosanitary certificates. FAO, Roma.
- FAO/IPGRI, 1994 - Genebanks standards. FAO/IPGRI, Roma.
- FENNER M., THOMPSON K., 2005 – The Ecology of seeds. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- FERRARI C., 2001 – Biodiversità dall'analisi alla gestione. Zanichelli Editore, Bologna.
- FLYNN S., TURNER R.M., DICKIE J.B., 2004 – Seed information Database (release 6.0, October 2004).
- FONT QUER P., 1993 - Diccionario de Botánica. Editorial Labor, S.A. - Escoles Pies, Barcelona.
- FRANCHI G.G., BELLANI L., NEPI M., PACINI E., 1996 - Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191: 143-159.
- FRANCHI G.G., NEPI M., PACINI E., 2002 - Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutive significance. *Plant Syst. Evol.*, 234: 211-227.
- FRANKEL O.H., BROWN A.H.D., BURDON J.J., 1995 – The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRISON E.A., JACKSON G.V.H., 1995 – Plant health and germplasm collectors - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- FRISON G., 1996 – Propagazione del pioppo. Edizioni l'Informatore Agrario, Verona.
- FU J.R., XIA Q.H., TANG L.F., 1993 - Effects of desiccation on excised embryonic axis of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation. *Seed Sci. Tech.*, 21: 85-95.
- GARCÍA M.A., 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.
- GARDIN L., COSTANTINI E.A.C., NAPOLI R. (eds.), 2002 – Guida alla descrizione dei suoli in campagna e alla definizione delle loro qualità. ISSDS, Firenze.
- GEROLA F.G., 1997 - *Biologia vegetale - Sistematica filogenetica*. UTET, Torino.
- GEROLA F.M. (ed.), 1995 - *Biologia e diversità dei vegetali*. UTET, Torino.
- GÓMEZ-CAMPO C., 2001 – La práctica de la conservación de semillas a largo plazo. In: GÓMEZ-CAMPO C. (ed.), 2001 - *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental*. Centro de estudios Ramon Areces, Madrid, Spain.
- GÓMEZ-POMPA A., 1987 - On Maya silviculture. *Mexican Studies*, 3(1): 1-17.

-
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., 1998 - Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Hort.*, 457: 133-142.
- GORIAN F., 2001 - La lavorazione di sementi di alberi e arbusti. In: PIOTTO B., DI NOI A. (eds.), 2001 - Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma.
- GRAUDAL L., KJAER E.D., CANGER S., 1995 - A systematic approach to the conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark. *Forest Ecology and Management*, 73: 117-134.
- GRIFFITH M., YAISH M.W.F., 2004 - Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9: 399-405.
- GROSS K.L., 1990 - A comparison of methods for estimating seed number in the soil. *J. Ecol.*, 78: 1079-1093.
- GUDIN S., ARENE L., CHAVAGNAT A., 1992 - Relation entre imbibition, densité, taux de remplissage et faculté germinative chez l'akène de *Rosa hybrida* L. *Agronomie*, 12: 123-126.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., 1983 - Plant propagation: principles and practices, 4th Edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., 1990 - Propagazione delle piante. Edagricole, Bologna.
- HARVENG T., MEIER-DINKEL A., DUMAS E., COLLIN E., 2004 - Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research*, 34: 43-55.
- HENDRIX S.D., 1984 - Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (*Umbelliferae*). *American Journal of Botany*, 71: 795-802.
- HERNÁNDEZ BERMEJO J.E., HERRERA MOLINA F., 2005 - REDBAG: the Spanish Network of genebanks for wild plants. *BGjournal*, 2(2): 18-20.
- HESLOP-HARRISON J.S., HESLOP-HARRISON Y., SHIVANNA K.R., 1984 - The evaluation of pollen quality and further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 367-375.
- HEYWOOD V.H. (ed.), 1995 - Global Biodiversity Assessment. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- HIRANO T., GODO T., MII M., ISHIKAWA K., 2005 - Cryopreservation of immature seeds of *Blechnum striatum* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23: 534-539.
- HOEKSTRA F.A., 1995 - Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- HONG T.D., ELLIS R.H., 1996 - A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1. (ENGELS J.M.M., TOLL J., vol. eds.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- HONG T.D., LININGTON S., ELLIS R.H., 1998 - Compendium of information on seed storage behaviour, I: A-H. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HULME P.E., 1994 - Post-dispersal seed predation in grassland - Its magnitude and sources of variation. *J. Ecol.*, 82: 645-652.
- HULME P.E., 1998 - Post-dispersal seed predation: consequence for plant demography and evolution. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, 1: 32-46.
- IBPGR, 1982 - The design of seed storage facilities for genetic conservation. Handbooks for genebanks: n. 1. Revised 1985 and 1990. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IBPGR, 1985a - Handbook of seed technology for genebanks. Vol. I. Principles and Methodology. Handbooks for genebanks: n. 2. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

-
- IBPGR, 1985b – Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations Handbooks for genebanks: n. 3. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- ISTA, 2004 - International rules for seed testing. Edition 2004. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- ISTA, 2006 - International rules for seed testing. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- IUCN, 1994 - IUCN Red List Categories. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2001 - IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1 IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003a – Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003b - Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels: Version 3.0. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- JIMENEZ R., CABALLERO M., 1990 - El cultivo industrial de plantas en maceta. Ediciones de Horticultura SL, Reus.
- JONES S., GOSLING P., 1994 – Target moisture content prechill overcomes the dormancy of the temperate conifer seeds. *New Forests*, 8: 309-321.
- KOO B., PARDEY P., WRIGHT B., 2004 – Saving seeds. IPGRI and IFPRI. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- LAHIRI A.N., KHARABANDA B.C., 1961 – Dimorphic seeds in some arid zone grasses and the significance of growth differences in their seedlings. *Sci. and Cult.*, 27(9): 448-450.
- LAMBARDI M., 2002 – Biotechnology in agriculture and forestry, 50. In: TOWILL L.E., BAJAJ Y.P.S. (eds.), 2002 - Cryopreservation of Plant germplasm II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- LANDIS T., LUCCI S., PIOTTO B., 2004 - Propagazione delle *Salicaceae*, conservazione della biodiversità nel ripristino ambientale. *Sherwood*, 88: 31-33.
- LECK M.A., 1989 - Wetland seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, San Diego.
- LEE T.D., 1988 - Patterns of fruit and seed production. In: LOVETT DOUST J., LOVETT DOUST L. (eds.), 1988 - Plant reproductive ecology: patterns and strategies. Oxford University Press, New York.
- LÉFÈVRE F., BARSOUM N., HEINZE B., KAJBA D., ROTACH P., DE VRIES S.M.G., TUROK J., 2001 – *In situ* conservation of *Populus nigra*. IPGRI, International Plant Genetic Resources, Rome.
- LININGTON S.H., 2003 – The Design of Seed Banks. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LISCI M., BIANCHINI E., PACINI E., 1996 - Structure of the elaiosome in some angiosperm species. *Flora*, 191: 131-141.
- LISCI M., PACINI E., 1997 - Fruit and seed structural characteristics and seed dispersal in *Mercurialis annua* L. (*Euphorbiaceae*). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 66: 379-386.
- LOVEJOY T.E., RANKIN J.M., BIERREGARD R.O., BROWN K.S., EMMONS L.H., VAN DE

-
- VOORT M.E., 1984 - Ecosystem decay of Amazon Remnants. In: NITECKI M.H. (ed.), *Extinctions*. University of Chicago Press, Chicago.
- LUBRANO L., 1992 – Micropropagation of poplars (*Populus* spp.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, 18. In: BAJAJ Y.P.S. (ed.), 1992 - High tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MABBERLEY D.J., 1997 - The plant book: a portable dictionary of the vascular plants, 2nd eds. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- MACDONALD B., 1987 - Practical woody plant propagation for nursery growers. Timber Press, Portland, Oregon.
- MARION W., GEORGE R., 2001 - Calculation of solar radiation using a methodology with world-wide potential. *Solar Energy*, 71(4): 275-283.
- MARSHALL D.R., BROWN A.H.D., 1983 - Theory of forage plant collection. In: MCIVOR J.G., BRAY R.A. (eds.), 1983 - Genetic Resources of Forage Plants. CSIRO, Melbourne.
- MARTIN A.C., 1946 - The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist*, 36: 513-660.
- MARTIN A.C., BARKLEY W.D., 1961 - Seed identification manual. University of California Press, Berkeley.
- MARTIN C., MARTINEZ-LABORDE J.B., PEREZ C., 1998 - The use of X-ray radiography in the assessment of conserved seeds of six halophytic species of *Limonium*. *Journal of Arid Environments*, 38: 245-253.
- MARZALINA M., KRISHNAPILLAY B., 1999 - Recalcitrant seed biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON E.E. (ed.), 1999 - Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, London.
- MAUSETH J.D., 2000. *Botanica - Fondamenti di biologia delle piante*. Nuova Editoriale Grasso, Bologna.
- MERRITT D.J., KRISTIANSEN M., FLEMATTI G.R., TURNER S.R., GHISALBERTI E.L., TRENGOVE R.D., DIXON K.W., 2006 – Effects of a butenolide present in smoke on light-mediated germination of Australian Asteraceae. *Seed Science Research*, 16: 29-35.
- MEZZALIRA G., PIOTTO B. (eds.), 2003 – Biodiversità e vivaistica forestale: aspetti normativi, scientifici e tecnici. APAT Manuali e Linee Guida 18/2003, Roma.
- MILLER M., 2000 – Fire autoecology. In: BROWN J.K., SMITH J.K., (eds.) 2000 - Wildland fire in ecosystems, effects on fire and flora. Gen.Tech. Rep. RMRS-42, 2. Ogden UT, USDA Forest Service, Rocky Mt. Res. St.
- MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE, 1993 – Metodi Ufficiali di Analisi delle Sementi. Decreto Ministeriale 22 dicembre 1992. Supplemento ordinario n. 2 del 4 gennaio 1993. Gazzetta Ufficiale Serie Generale, Parte Prima, Roma.
- MONTELEONE I., FERRAZZINI D., CAMERANO P., GRIECO C., PIOTTO B., BELLETTI P., 2005 - Definizione di regioni di provenienza per il frassino maggiore. *Sherwood*, 115: 5-10.
- MONTELEONE I., GORIAN F., BELLETTI P., 2005b - Strategie di conservazione e gestione della biodiversità nella filiera di produzione di materiale forestale di propagazione. Atti IV Convegno SISEF, Pignola (PZ), 7-10 ottobre 2003.
- MOSSA L., GUARINO R., FOGU M.C., 2004 – La componente terofitica della flora della Sardegna: forme di crescita, ecologia, corologia e sinsistemica. *Rend. Sem. Fac. Sci. Univ. Cagliari*, 73 (suppl. n. 2): 1-209.
- MUSMARRA A., 1996 – Dizionario di Botanica. Edagricole, Bologna.

-
- NAMKOONG G., 1988 - Sampling for germplasm collections. *HortScience*, 23:79-81.
- NEPI M., FRANCHI G.G., PACINI E., 2001 - Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216: 171-180.
- NEPI M., PACINI E., 1993 - Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany*, 72: 526-536.
- NIKOLAEVA M.G., 1969 - Physiology of deep dormancy in seeds. Israel Programme for Scientists Translations, Jerusalem.
- NORMAH M.N., MARZALINA M., 1996 - Achievements and prospects of in vitro conservation for tree germplasm. In: NORMAH, M.N. (ed.), 1996 - In vitro Conservation of Plant Genetic Resources, UKM.
- NORSE E.A. (ed.), 1993 - Global marine biodiversity. Island press, Washington, DC.
- OGAWA K., IWABUCHI M., 2001 - A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 42(3): 286-291.
- ORTEGA M., LEVASSOR C., PECO B., 1997 - Seasonal dynamics of Mediterranean pasture seed banks along environmental gradients. *J. Biogeogr.*, 24: 177-195.
- PACINI E., 1981 - L'impollinazione: una recente rassegna. *Informatore Bot. Ital.*, 13: 103-117.
- PACINI E., 1990 - *Mercurialis Annua* L. (*Euphorbiaceae*) Seed Interactions With The Ant *Messor structor* (Latr.), *Hymenoptera: Formicidae*. *Acta Bot. Neerl.*, 39: 253-262.
- PACINI E., 1996 - Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sex. Pl. Reprod.*, 9: 362-366.
- PACINI E., 1997 - Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Can. J. Bot.*, 75: 1448-1459.
- PACINI E., 2000 - From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Syst. Evol.*, 222: 19-43.
- PACINI E., FRANCHI G.G., 1998 - Pollen dispersal units, gynoecium and pollination. In: OWENS S.J., RUDALL P.J. (eds.), 1998 - Reproductive Biology. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PACINI E., FRANCHI G.G., LISCI M., NEPI M., 1997 - Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann. Bot.*, 80: 83-87.
- PACINI E., GUARNIERI M., NEPI M., 2006 - Pollen carbohydrates and water content during development, presentation and dispersal: a short review. *Protoplasma*, in press.
- PACINI E., HESSE M., 2004 - Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora*, 199: 273-285.
- PACINI E., HESSE M., 2005 - Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora*, 200: 399-415.
- PÁLFI G., MIHALIK E., 1985 - Proline staining as a new method for determining the viability of pollen in wind and insect pollinated plants. *Acta Bot. Hung.*, 31: 315-321.
- PANIS B., SWENNEN R., ENGELMANN F., 2001 - Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Hort.*, 560: 79-86.
- PARKER V.T., KELLY V.R., 1989 - Seed banks in California chaparral and other Mediterranean climate shrublands. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Accademic Press, San Diego.
- PARKER V.T., LECK M.A., SIMPSON R.L., 1989 - Pattern and process in the dynamics of seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Accademic Press, San Diego.
- PECO B., LEVASSOR C., ORTEGA M., 1998 - Similarity between seed banks and vegetation in

-
- Mediterranean grassland: a predictive model. *J. Veg. Sci.*, 9: 815-828.
- PERRINO P., TERZI M., 2003 – Importanza della conservazione del germoplasma. In: BRESSAN M., MAGLIARETTA L., PINO S. (eds.), 2003 - Cereali del Veneto. Regione Veneto/Prov. di Vicenza/Veneto Agricoltura.
- PIGNATTI S., 1982 - Flora d'Italia. Edagricole, Bologna.
- PIGNATTI S. (ed.), 1995 – Ecologia Vegetale. UTET, Torino.
- PIGNATTI S., MENEGONI P., GIACANELLI V. (eds.), 2001 - Liste rosse e blu della flora italiana. ANPA, Roma.
- PINNA M., 1977 - Climatologia. UTET, Torino.
- PIOTTO B., 1992 – Semi di alberi e arbusti coltivati in Italia. Società Agricola e Forestale – Gruppo E.N.C.C.
- PIOTTO B., 1997 – Nuove tecniche per preservare la variabilità dei caratteri genetici in alberi e arbusti con semi dormienti. *EM Linea Ecologica*, 29(2): 51-54.
- PIOTTO B., 2005 - La propagazione per seme. In: CERVELLI C. (ed.) 2005 - Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare. Collana Sicilia Foreste, 26. Regione Siciliana, Agrigento.
- PIOTTO B., AMADEI M., 2004 - Conserviamo i semi per difendere la natura. *Alberi e Territorio*, 10-11.
- PIOTTO B., CROSTI R., 2005 - Metodo per individuare le esigenze ecofisiologiche per la germinazione. *Alberi e Territorio*, 12: 41-44.
- PIOTTO B., DI NOI A. (eds.), 2001 - Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma.
- PIOTTO B., DI NOI A. (eds.), 2003 - Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs. APAT, Roma.
- PIOTTO B., FALLERI E., BRUNORI A. (eds.) 2005 - Propagazione di specie vegetali di particolare valore ecologico dell'Appennino Umbro-Marchigiano. APAT, Rapporti, 52: 1-103.
- PIOTTO B., FALLERI E., PORTA-PUGLIA A., 2001 – La qualità del seme. In: PIOTTO B., DI NOI A. (eds.) 2001 - Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma.
- PRIMACK R.B., 1992 - Tropical community dynamics and conservation biology. *BioScience*, 42: 818-821.
- PRITCHARD H.W., DICKIE J.B., 2003 – Predicting Seed Longevity: the use and abuse of seed viability equations. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PROBERT R.J., 2003 – Seed Viability under Ambient Conditions, and the Importance of Drying. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PUPILLO P., CERVONE F., CRESTI M., RASCIO N., 2003 - Biologia vegetale. Zanichelli, Bologna.
- RAJORA O.P., ZUFFA L., 1986 – Pollen viability of some *Populus* species as indicated by in-vitro pollen germination and tetrazolium chloride staining. *Can. J. Bot.*, 64: 1086-1088.
- RAUNKIAER C., 1934 - The life forms of plants and statistical plant geography. Univ. Oxford, Oxford.
- RAVEN P.H., EVERT R.F., EICHORN S.E., 2002 - Biologia delle Piante. Zanichelli, Bologna.
- RAY PETER M., STEEVES TAYLOR A., FULTS SARA A., 1985 – Botanica. Zanichelli, Bologna.
- RAYMOND A.T.G., 1989 - Producción de semillas de plantas hortícolas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

-
- RICE K.J., 1989 - Seed aging, delayed germination and reduced competitive ability in *Bromus tectorum*. Plant Ecol., 155: 237-243.
- RIVAS-MARTÍNEZ S., DÍAZ T.E., FERNÁNDEZ-GONZÁLES F., IZCO J., LOIDI J., LOUSÃ M., PENAS A., 2002 - Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. Itinera Geobot., 15(1): 5-432.
- ROBERTS E.H., 1973 - Predicting the storage life of seeds. Seed Science and Tecnology, 1: 499-514.
- ROBERTS H.A., 1981 - Seed banks in soil. Advances in Applied Biology, 6: 1-55.
- ROYAL BOTANIC GARDENS KEW 2005 - A field manual for seed collectors. Wakehurst Place, UK.
- RUANO R., 2003 - Viveros Forestales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1990 - Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep., 9: 30-33.
- SCHMIDT L., JØKER D., 2001 - Technical note no. 59 - Glossary of seed biology and technology. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- SCHOENIKE R.E., BEY C.F., 1981 - Conserving genes through pollen storage. In: FRANKLIN E.C. (ed.), 1981 - Pollen management hand book. United States Department of Agriculture. Forest Service Agriculture Handbook, 287: 72-73.
- SCOPPOLA A., SPAMPINATO G. (eds.), 2005 - Atlante delle specie a rischio di estinzione. In: SCOPPOLA A., BLASI C. (eds.), 2005 - Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia. Palombi Editore, Roma.
- SERNARDER R., 1906 - Entwurf Enier Monographie Der Europäischen Myrmekochoren. Kungl. Svensk. Verternsk. Handligar, 41: 1-410.
- SIMAK M., 1980 - Germination and storage of *Salix caprea* L. and *Populus tremula* L. seeds. IUFRO Working party on seeds problems, Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Seeds Storage, Petawawa Nat. For. Inst, Canada.
- SMITH R.D., 1995 - Collecting and handling seeds in the field - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK.
- SOIL SURVEY STAFF, 1998 - Keys to Soil Taxonomy, 8th edition. USDA-NRCS. Washington, D.C.
- SPERANZA A., CALZONI G.L., PACINI E., 1997 - Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. Sex. Pl. Reprod., 10: 110-115.
- STANTON B.J., VILLAR M., 1996 - Controlled reproduction of *Populus*. In: STETTLER R.F., BRADSHAW H.D., HEILMAN P.E., HINCKLEY T.M. (eds.), 1996 - Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada.
- STEARN W.T., 1980 - Botanical Latin. David & Charles Publishers, London.
- STRASBURGER E., 1995 - Trattato di Botanica: parte generale e parte sistematica. Antonio Delfino Editore, Roma.
- SUSZKA B., MULLER C., BONNET-MASIMBERT M., 1994 - Graines des feuillus forestiers, de la récolte au semis. INRA Editions, Paris.
- TERRY J., PROBERT R.J., LININGTON S.H., 2003 - Processing and Maintenance of the Millennium Seed Bank Collections. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 - Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.

-
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DOUMA D.J., MARANGAKI C.J., 1991 – Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. *Ann. Bot.*, 68: 469-475.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DELIPETROU P., 1994 - Photoinhibition of seed germination in the maritime plant *Matthiola tricuspidata*. *Ann. Bot.*, 73: 639-644.
- THANOS C.A., DOUSSI M.A., 1995 – Ecophysiology of seed germination in endemic *Labiates* of Crete. *Isr. J. Plant Sci.*, 43: 227-237.
- THOMPSON K., 1986 - Small-scale heterogeneity in the seed banks of an acidic grassland. *J. Ecol.*, 74: 733-738.
- THOMPSON K., 1993 - Persistence in soil. In: HENDRY G.A.F., GRIME J.P. (eds.), 1993 - *Methods in Comparative Plant Ecology. A Laboratory Manual*. Chapman & Hall, The Netherlands.
- THOMPSON K., BAND S.R., HODGSON J.G., 1993 – Seed size and shape predict persistence in the soil. *Funct. Ecol.*, 7: 236-241.
- THOMSEN K., KIKLEV S., 2000 – Technical note no. 57 – Laboratory manual for basic tree seed studies. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- THOMSON J.R., 1979 - Introducción a la Tecnología de las semillas. Ed. Acribia, Zaragoza.
- TOKUHARA K., MII M., 1993 - Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep.*, 13: 7-11.
- TONZIG S., MARRE' E., 1971 - *Botanica generale*. CEA, Milano.
- TOOLE V.K., BAILEY W.K., TOOLE E.H., 1964 – Factors influencing dormancy of peanut seeds. *Plant physiol.*, 39(5): 768-772.
- UBALDI D., 2003 – *Flora, fitocenosi e ambiente*. Clueb, Bologna.
- URAGAMI A., SAKAI A., MAGAI M., 1990 - Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. *Plant Cell Rep.*, 9: 328-331.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., TAKAHASHI T., 1989 - Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 8: 418-421.
- VANDEN BROECK A., JOCHEMS H., STORME V., VAN LOY K., 2002 – Strategies for restoration of natural populations of Black Poplar (*Populus nigra* L.) along the Maas valley. Vlaams Impulsprogramma Natuurontwikkeling. Eindrapport 0010.
- VENORA G., GRILLO O., 2006 - Application of an image analysis system to differentiate bean cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture*, in press.
- VENORA G., GRILLO O., SHAHIN M.A., SYMONS S.J., 2006 - Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil by image analysis system. *Genetic Resources and Crop Evolution*, in press.
- VESPRINI J.L., NEPI M., CRESTI L., GUARNIERI M., PACINI E., 2002 - Changes in cytoplasmic carbohydrate content during *Helleborus* pollen presentation. *Grana*, 41: 16-20.
- VIEGI L., EVANGELISTI R., PACINI E., 2003 - The achene pappi and elaiosomes of *Centaurea* L.: dispersal and germination in some Italian species. *Israel J. Pl. Sci.*, 51: 45-54.
- VIETTO L., CHIARABAGLIO P.M., 2004 – Restoration of floodplain woodlands with native Poplars (*Populus nigra* and *Populus alba*): some case of study along the Po river. *River Restoration 2004. Principles, Processes, Practices*. Proceedings 3rd ECRR International Conference on River Restoration in Europe. Zagreb, Croatia, 17-21 May 2004.
- VIETTO L., BIANCO B., 2005 – Progress on national activities on gene conservation of Black poplar (*Populus nigra* L.) and White poplar (*Populus alba* L.) in Italy. *European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN) Populus nigra Network*. Report of the seventh (25-27 Oc-

-
- tober 2001, Osijek, Croatia) and eighth (22-24 May 2003, Treppeln, Germany). (J. Koskela, S.M.G. de Vries, D. Kajba and G. von Wuelish, compilers). International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- VILARNAU A., GONZÁLEZ J., 1999 - Planteles, semilleros, viveros. Compendios de horticultura, 13. Ediciones de Horticultura, Reus.
- VON BOTHMER R., SEBERG O., 1995 – Strategies for the collecting of wild species - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK.
- WALTERS C., 2004 – Guidelines for seed storage. In: GUERRANT E., HAVENS K., MAUNDER M. (eds.), 2004 - *Ex situ* plant conservation, supporting species survival in the wild. Island Press.
- WERKER E., 1997 - Seed Anatomy. Encyclopedia of plant anatomy, 10. Gebr der Borntraeger, Berlin.
- WILLIAMS C., DAVIS K., CHEYNE P., 2003 - The CBD for Botanists: An Introduction to the Convention on Biological Diversity for people working with botanical collections. Royal Botanic Gardens, Kew.
- WILSON E.O., 1992 – The diversity of life. Cambridge University Press, Cambridge.
- WILSON S.M.G., SAMUEL C.J.A., 2003 - Genetic conservation of native trees. Forest Research Annual Reports and Accounts 2002-2003: 56-61.
- WITHERS L.A., KING P.J., 1980 - A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. Cryo Letters, 1: 213-220.
- WITT S., 1985 - Biotechnology and Genetic Diversity. California Agricultural Lands Project, San Francisco.
- ZANGHERI P., 1942 - Flora e vegetazione dei calanchi argillosi pliocenici della Romagna. Romagna Fitogeografica, 2: 159-190.

INDICE ANALITICO

Abies60; 153
Abies cephalonica111
Abies nordmanniana111
Abies alba111
Abies pinsapo111
Abscissione160; 183
Acanthus mollis155
accessioni18; 19; 21; 23; 25; 37; 46;
Acer85; 142
Acer campestre111
Acer monspessulanum111
Acer opalus111
Acer platanoides111
Acer pseudoplatanus90; 112
Achenio147
Acido gibberellico101
Acis nicaeense90
Aesculus66
Aesculus hippocastanum166
Affumicazione96; 147
Afillia147
Agamico147
Agamospermie147
Agar101
Agave66
agenti patogeni46; 53; 54
Agrostemma githago143
Albumi147; 155
Albuminato147
allegagione50
alleli37
Allium150; 151
Allogamia147
Allopatia147
Alnus60
Alnus incana112
Alnus cordata112; 167
Alnus glutinosa112
Alnus viridis112
Alofite148
Amelanchier ovalis112
Analisi d'immagine137; 148
Analisi radiografica64
analizzatori di umidità62
Anchusa formosa45; 57; 79; 142
Anchusa littorea79
Androceo148
Anemocoria142; 148
Anemone142
Anfimissia148
Angiospermae48; 147; 148; 152; 154; 156; 160; 162;
166

anossia88; 91
antera47; 48; 49; 50; 51; 148
antesi148
Apiaceae73; 90; 142; 165
apici meristematici75; 76
aploide47; 148
Apocarpico148
Apomissia148
apparati radicali84
Arachis hypogaea142
Araucaria araucana166
arboreti da seme37
arboreto38
arboricoltura da legno37
Arbutus unedo112
area geografica19
Area omogenea148
Areale148
Arillo148
Arthocarpus66; 77
Asparagus albus68
Associazione31; 148; 152; 160
Asteraceae51; 73; 77; 142; 143; 147; 151; 161
Astone148
Astragalus102; 139
Astragalus maritimus90; 97
Astragalus verrucosus90
Attecchimento148
attività dell'acqua68; 149
attività enzimatiche50; 63
Autocoria142; 149
Autoctono149
Autodisseminazione149
autogame40
Autoimpollinazione149
Autotrofo149
azoto liquido74; 75; 76; 77; 78; 84
Bacca149
balistocoria142; 149
Banc de Llavors Forestals33; 62
banca dei semi del suolo145; 146
Banca del Germoplasma della Sardegna62; 82; 100;
101; 106; 172
Banche dei geni149
Banche dei semi149
Banche del germoplasma17; 30; 149
banche durature145
banche transitorie145
barattoli in vetro71
barbatelle127; 128
base genetica36; 38
Berberis vulgaris112
Betula pendula112
Betula pubescens91
BGCI26; 176

<i>Bignonia</i>	142	<i>Centaurea</i>	143; 144
Biloculare	149	<i>Centaurea jacea</i>	143
Biocenosi	149	<i>Centaurea parlatoris</i>	143
Bioclima	149	<i>Centranthus amazonum</i>	46
Biodiversità...VII; X; 17; 18; 19; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 30; 33; 34; 38; 56; 108; 109; 127; 145; 149		Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale	38; 109
biologia della conservazione	18	<i>Ceratonia siliqua</i>	113
Biologia della conservazione	150	<i>Cercis siliquastrum</i>	113
biologia riproduttiva	37; 44; 47	certificato fitosanitario	54
Biotopo	150	certificazione	33; 38
<i>Bletilla striata</i>	78	<i>Chelidonium</i>	143
Bosco da seme	150	<i>Chilling</i>	Vedi Stratificazione fredda
Bottinatore	150	ciclo riproduttivo	19
<i>Brassicaceae</i>	73; 77	Ciclo vegetativo	151
Brattea	150	Ciclofisi	84; 151
<i>breeding</i>	127	Cipsela	151
Bulbilli	150	<i>Cirsium arvense</i>	143
Bulbo	39; 84; 86; 150	<i>Cistaceae</i>	77; 96
Bustine in alluminio	70	Cleistogamia	151
<i>Buxus sempervirens</i>	112	<i>Clematis</i>	142
<i>Cactaceae</i>	147	<i>Climax</i>	151
Caducifolia	150	clone	23; 38; 74; 130; 151
<i>Calamus</i>	66; 77	codice alfanumerico	56
calendario fenologico	41	Coerenza	151
<i>Calendula arvensis</i>	144	cold-test	65; 169
<i>Calluna</i>	85	Collezione a lungo termine	151
<i>Camellia sinensis</i>	67	Collezione attiva	78; 151
Camera di crescita	99; 150	Colorimetria	152
campionamento ..24; 36; 37; 38; 39; 41; 44; 46; 54; 150		culture meristematiche	64; 170
<i>Campionamento genetico</i>	37	<i>Colutea arborescens</i>	113
Campione	150	Commensalismo	152
campioni d'erbario	46; 47	commercio	21; 24; 26; 71
capacità germinativa	42; 58; 62; 63; 150	Competizione	152
Capsula	150	Confettatura	152
Capsula Petri	150	Congelamento	152
<i>Cardamine</i>	142	congelazione	68; 72; 73; 74; 75; 77; 78
<i>Cardamine bulbifera</i>	150	conservare a lungo termine	72
<i>Carduncellus dianius</i>	82	<i>Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles</i>	33; 97; 106; 173; 177
Cariologia	151	conservazione .X; 17; 18; 19; 22; 23; 24; 26; 27; 30; 31; 32; 33; 34; 36; 37; 38; 40; 43; 44; 46; 47; 49; 51; 54; 55; 56; 58; 61; 62; 65; 66; 67; 68; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 77; 78; 83; 84; 85; 86; 191	
Cariosside	151	conservazione ecoregionale	27
Carpello	151	Conservazione <i>ex situ</i>	152
<i>Carpinus betulus</i>	113	conservazione <i>in situ</i> X; 18; 22; 38; 40; 44; 78; 83; 127; 150; 152	
<i>Carpinus orientalis</i>	113	contenitori	54; 58; 62; 68; 70; 71; 80
Carta filtro	151	contenitori criogenici	76
Caruncola	151	contenuto in umidità	65; 66; 68; 76; 77; 131
<i>Caryophyllaceae</i>	77	convenzione CITES	21
<i>Castanea</i>	66	Convenzione di Berna	21
<i>Castanea mollissima</i>	67	Convenzione sulla Diversità Biologica ...VII; 17; 22; 24	
<i>Castanea sativa</i>	113	convenzioni internazionali	19; 21
Catafillo	151	Convergenza ecologica	152
Categorie di semi	151		
<i>Cedrus</i>	60; 113; 153		
<i>Celtis australis</i>	113		
cemento pollinico	51		
censimento	24; 134		

<i>Convolvulaceae</i>	96	dominio biogeografico	27
<i>core-collection</i>	128	dormienza41; 63; 65; 88; 90; 91; 92; 93; 95; 96; 99;	
<i>Coriaria myrtifolia</i>	113	104; 108; 109; 110; 111; 113; 114; 116; 117; 121; 122;	
<i>Cornus</i>	84; 124	124; 125; 126; 144; 147; 151; 154; 157; 158; 159; 163;	
<i>Cornus mas</i>	114	167; 170	
<i>Cornus sanguinea</i>	114	dormienza complessa.....	109
<i>Corydalis</i>	143	dormienza primaria.....	91; 108; 110
<i>Corylus avellana</i>	114	dormienze	121; 124
cotiledoni	61; 96; 135; 152; 153; 155; 157; 158	dormienze indotte o secondarie	91
<i>Cotinus coggygia</i>	115	Drenaggio	154
<i>Crataegus</i>	115; 124	drupa	42
<i>Crespis</i>	142	Drupa	154
crioconservazione	32; 74; 75; 76; 77; 78; 84; 152	uplicazione	34; 37; 43; 83
<i>criovials</i>	77; 78; 152	Duplicazione delle collezioni	83; 154
Crittogame	152	ecoregione	27
<i>Cucurbita pepo</i>	50	ecosistemi	22; 24; 26; 77; 154
cultivar	23; 30; 152; 170	Ecotipo	154
<i>Cupressus</i>	60	Ecotono.....	154
<i>Cyclamen</i>	88	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	90; 115
<i>Cyperaceae</i>	73	<i>Elaeagnus umbellata</i>	115
<i>Cytisus</i>	115; 142; 143	<i>Elaeis</i>	66; 77
<i>Cytisus scoparius</i>	142; 143	elaiosoma	143; 144; 154
Decidua.....	153	Eliofilia.....	154
deidratazione	42; 48; 57; 58; 60; 61; 65; 66; 67; 68; 71;	embrione.....	42; 61; 64; 75; 76; 77; 78; 88; 90; 91; 97; 126;
73; 74; 75; 76; 77; 153; 193		147; 152; 153; 154; 156; 160; 162; 165	
Deidratazione all'aria	75	embrioni	75; 76
deiscenti	42; 153	embrioni zigotici.....	76; 77
Demografia	153	<i>Emerus majus</i>	114
Densità di popolazione	153	endemicità	17; 18; 34
dessiccanti artificiali	68; 153	Endemismo	154
deumidificatori	67	Endosperma primario	154
<i>diacetato di fluoresceina</i>	64; 163	Endosperma secondario	154
<i>Dianthus turoloensis</i>	81	endozoocoria	142; 143; 154
<i>Dianthus turoloensis</i> Pau & Pau	81	Ensconet	31; 34
Diaspora	142; 153	Entomofilia	154
Dicline	153	enzimi deidrogenasi.....	63
Dicotiledoni	153	Epicarpo.....	155
Differenziazione	153	epicotile	131; 155; 157
dinamica di popolazioni	44	Epidermide	155
Dioico	153	Epifite	155
diplocoria.....	142; 144; 153	epizoocoria	142; 143; 155
Diploide	153	equazione di vitalità.....	65
<i>Direttiva 1999/105/CE</i>	23	ERH	Vedi umidità relativa
<i>Direttiva 92/43/CEE</i>	22	<i>Erica</i>	85
Direttive di Bonn	27; 28	<i>Erica arborea</i>	115
Disalatura.....	153	<i>Ericaceae</i>	96; 147
disidratazione.....	81; 84; 107; 114; 117; 121; 128; 129;	Ermafrodita.....	155
131; 133; 144; 153; 166		Esalbuminato	155
Dispersione	141; 143; 153; 154	<i>ESPC</i>	26
Disseccamento	153	Essiccazione	155
disseminazione	38; 41; 66; 91; 117; 124; 125; 130; 131;	<i>estivazione</i>	Vedi Stratificazione calda
142; 148; 149; 153; 154; 155; 157; 160; 161; 166; 169		<i>Estrazione a caldo</i>	60
ditiocarbammati	128	<i>Estrazione a freddo</i>	60
diversità genetica	39; 40; 46; 108; 124; 150; 152	<i>Estrazione manuale</i>	59
diversità vegetale	26; 31; 33	<i>Eunonymus</i>	85

<i>Euonymus europaeus</i>	116	GA3	Vedi Gibberelline
<i>Euphorbia</i>	90; 143; 144	Galbulo	156
<i>Euphorbia cyparissias</i>	143	Gamete	156
<i>Euphorbia lathyris</i>	143	Gametofito	156
<i>Euphorbiaceae</i>	73; 143; 151	Gamica	156
<i>European Forest Genetic Resources Program</i>	128	gel di silice	68; 70; 71; 75; 76; 77; 83; 156
<i>ex situ</i> ..X; 17; 18; 19; 22; 24; 26; 30; 31; 32; 34; 40; 44; 55; 62; 78; 83		gemme	85; 86; 128; 155; 170
<i>exsiccata</i>	21	<i>Genista</i>	47; 117; 147
<i>Fabaceae</i>	59; 62; 73; 90; 96; 100; 147; 159	<i>Genista pilosa</i>	117
facoltà germinativa ..	130; 131; 132; 150; 155; 156; 165	<i>Genista radiata</i>	117
<i>Fagaceae</i>	66; 161	<i>Genista tinctoria</i>	117
<i>Fagus</i>	60	Genmedoc	31; 33; 57; 83
<i>Fagus sylvatica</i>	67; 88; 101; 116	genotipi	37; 38; 40; 84
Fecondazione	155	genotipico	23; 38
<i>Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français</i>	32	genotipo	38; 84; 156
Fenologia	155	Geofite	156
fenotipico	23; 38	<i>Geranium</i>	142
fenotipo	37; 155	Germinabilità	156
Fermentazione anaerobica	155	germinazione ..	40; 52; 57; 58; 59; 63; 65; 66; 73; 74; 78; 79; 80; 81; 82; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 108; 109; 110; 113; 114; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126; 127; 131; 132; 133; 137; 143; 144; 145; 146; 147; 148; 150; 151; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 163; 165; 166; 167; 168; 169; 170
fertilizzazione	81	Germinazione epigea	157
<i>Ferula loscosii</i>	90	Germinazione ipogea	157
<i>Ficus carica</i>	142	germinelli	102; 131
<i>Filago mareotica</i>	82	germinelli anomali	131
Fitocenosi	155	Germoglio	157; 163
Fittone	155	germoplasma ..X; 17; 18; 19; 21; 24; 30; 31; 32; 33; 34; 37; 38; 39; 40; 41; 43; 44; 45; 46; 47; 49; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 61; 64; 67; 70; 72; 74; 75; 76; 77; 78; 82; 83; 157; 191	
Flaconi in vetro	70	gibberelline	91; 95; 99; 157
Follicolo	155	Gineceo	148; 157
forestazione	38	Glicerina	157
Forma biologica	155	granuli	47; 48; 49; 50; 51; 83; 84
Formaldeide	156	Granulo pollinico	157
formazan	63; 156	GSPC	26
Formazioni	156	<i>Gymnospermae</i>	48; 148; 152; 154; 157; 168
fotoperiodo	81; 87; 100; 125; 150; 155; 156	habitat ..	18; 19; 22; 26; 27; 32; 33; 34; 36; 41; 79; 124; 127; 134; 152; 153; 157
fotosensibilità	88; 92; 99	<i>Hevea</i>	66; 77
fotosensibilità negativa	88	<i>Hieracium</i>	142
fotosensibilità positiva	88	<i>Hippophae rhamnoides</i>	117
<i>Fragaria vesca</i>	142	HLS	137; 140; 157
<i>Frangula alnus</i>	116	<i>Hura crepitans</i>	142
<i>Frangula rupestris</i>	116	Hymexazol	102
<i>Fraxinus</i>	91; 126; 142	IBPGR	Vedi IPGRI
<i>Fraxinus angustifolia</i>	116	ibridazione	40; 41; 157
<i>Fraxinus chinensis</i>	90	Ibrido	157
<i>Fraxinus excelsior</i>	91; 116; 126	<i>Idrocoria</i>	142; 157
<i>Fraxinus ornus</i>	116	Idrofite	157
frutti ..	39; 41; 42; 43; 46; 49; 50; 52; 57; 58; 59; 109; 112; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 123; 124; 131; 136; 141; 142; 143; 144; 147; 148; 149; 150; 151; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 161; 162; 163; 165; 169; 170	Igroscopico	158
funghi	19; 26; 46; 85		
fungicidi	53; 86; 99; 107		
Funicolo	156		
<i>fynbos</i>	96		

<i>Ilex</i>	85; 124	<i>Linaria arcusangeli</i>	91
<i>Ilex aquifolium</i>	117	lioofilizzazione	72; 73; 74; 104; 151
Ilo	158	Liste Rosse	25
imbibizione	64; 87; 88; 90; 96; 97; 98; 100; 132; 158; 164; 169	Loculicida	159
imboschimenti	39	Loculo	159
Impollinazione	147; 154; 158	locus	37
impollinazione anemofila	40	Locus genico	159
Impollinazione diretta	158	<i>Lonicera</i>	85
Impollinazione incrociata	37; 147	<i>Lonicera alpigena</i>	118
Impollinazione indiretta o incrociata	158	<i>Lonicera etrusca</i>	118
<i>in situ</i>	18; 22; 24; 32; 34; 36; 38; 40; 53; 54; 62; 78	<i>Lonicera nigra</i>	118
incapsulazione	76; 77	<i>Lonicera xylosteum</i>	118
incendi	96; 147	Lotto	159
Incubatore	98; 150; 158	luce	50; 51; 64; 79; 81; 82; 87; 88; 89; 92; 96; 98; 99; 124; 125; 152; 157; 167
Indeiscnte	42; 158	<i>Lycopersicon esculentum</i>	42
<i>Index Seminum</i>	18; 78; 82; 151; 158	Macerazione	159
indicatore di umidità	70; 71; 82	Macrobioclima	159
Indigo Carmine	158	Macrosporofilli	159
Individuo	153; 156; 157; 158	<i>Magnoliopsida</i>	153
Infiorescenza	41; 158	<i>Malus</i>	85; 142
Infruttescenza	59; 158	<i>Malus sylvestris</i>	118
inibitori tegumentali	90	Manipolazione	159
inibizione tegumentale	90	marcatori	38
inibizioni alla germinazione	87	marze	85; 130
innesto a doppio spacco inglese	130	materiale propagativo	37
Inquinismo	158	maturazione	37; 39; 40; 41; 42; 50; 52; 58; 59; 64; 159
Insolazione relativa	158	maturazione scalare	41
introgressione	84	Meiosi	159
Invaiaura	158	<i>Melampyrum</i>	143
invecchiamento accelerato	65	Membrana cellulare	159
IPGRI	67; 68; 72; 95; 106	<i>Mercurialis annua</i>	142; 144
Ipocotile	158	Mericarpo	159
ISTA 61; 62; 63; 65; 87; 95; 96; 97; 101; 102; 103; 178; 181		Mesocarpo	159
IUCN	25; 26	<i>Mespilus germanica</i>	118
<i>Juglans regia</i>	117	metapopolazioni	39; 41; 159
<i>Juniperus communis</i>	117	Micorrize	160
<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>macrocarpa</i>	117	Micosi	160
KNO ₃	101; 132	Microclima	160
<i>Laburnum</i>	84	Micropilo	160
<i>Laburnum alpinum</i>	117	Microsporofilli	160
<i>Laburnum anagyroides</i>	90; 117	microstazioni	44
<i>Lactuca sativa</i>	89	Midollo	160
<i>Lamiaceae</i>	73	mirmecocoria	143; 160
<i>Lamium purpureum</i>	143	Mitosi	160
<i>Larix decidua</i>	118	<i>moisture content</i>	61; 67; 152; 160
<i>Lauraceae</i>	66	moltiplicazione	22; 23; 26; 34; 39; 47; 55; 86; 160
<i>Laurus nobilis</i>	118	Monitoraggio	68; 160; 193
Legume	159	Monocarpica	160
<i>Ligustrum vulgare</i>	118	Monocline	160
<i>Liliaceae</i>	73; 165	Monocotiledoni	160
<i>Lilium</i>	86; 150	Monoica	160
<i>Lilium bulbiferum</i>	150	<i>Moraceae</i>	66
<i>Limonium</i>	79; 80	Morfometria	160
		Morfotipi	160

<i>Morisia monanthos</i>	142	Pericarpo	162
<i>Morus</i>	47	Perisperma	162
<i>Morus alba</i>	119	Peso fresco dei semi	162
<i>Morus nigra</i>	119	Peso fresco dell'accessione	162
Mutualismo	160	Peso target	162
<i>Myrtus</i>	85	<i>Phillyrea angustifolia</i>	119
<i>Myrtus communis</i>	119	<i>Phillyrea latifolia</i>	119
NaCl	71; 88	<i>Phoenix</i>	142
<i>Narcissus</i>	86	<i>Phylum</i>	162
NATURA 2000	34	<i>Piano Nazionale sulla Biodiversità</i>	24
Naturalizzata	161	piante madri	38; 84; 128
<i>Nephelium</i>	66; 77	<i>Picea abies</i>	119
<i>Nerium</i>	85	Pietrosità	162
<i>Nerium oleander</i>	142	<i>Pinus</i>	60; 85; 119; 153
New Dogashima	78	Pioniera	19; 162
Nicchia ecologica	161	pirofite	96
Nocella	161	<i>Pistacia lentiscus</i>	120
<i>Nothofagus obliqua</i>	91	<i>Pistacia terebinthus</i>	120
N-P-K	81	Piumetta	162
<i>Nucula</i> o noce	161	Placenta	162
numero di accessione	53; 56; 57	plantule	65; 73; 80; 81; 82; 87; 99; 102; 103; 131; 133; 136; 137; 146; 162
<i>Olea europaea</i>	17	<i>Platanus</i>	142
<i>Oleaceae</i>	96	<i>Platanus orientalis</i>	120
olii	62; 68; 69	<i>Plumbaginaceae</i>	59
Ombrotipo	161	Plumula	162
<i>Ononis tridentata</i>	82	Pluricarpica	162
<i>Orchidaceae</i>	18; 48; 59; 64; 101; 142; 151	<i>Poaceae</i>	42; 47; 48; 50; 62; 73; 83; 97; 142; 147; 151
Origine	161	Policoria	163
Ornamentazione	161	Policormico	163
<i>Ornithogalum bulbiferum</i>	150	polimorfismo	36; 40; 163
Ornitocoria	161	pollenkitt	47; 49; 51; 163
Orofita	161	polline	17; 40; 41; 47; 48; 49; 50; 51; 64; 72; 75; 83; 84; 127; 130; 132; 133; 148; 149; 150; 158; 160; 163; 166; 167; 170
ortet	84; 161	Pollone	163
Ossidazione dei lipidi	66	<i>pool</i> genico	18; 38
ossigeno	70; 87; 88; 92; 97; 98; 155	popolamento	36; 38; 39; 40; 46; 47; 57; 59; 152; 164
<i>Ostrya carpinifolia</i>	119	popolazione	17; 19; 23; 31; 34; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 46; 53; 57; 60; 78; 84; 101; 104; 133; 134; 136; 137; 147; 150; 153; 154; 159; 163; 168; 170
Ovario	161	<i>Populus</i>	84; 85; 86; 124; 127; 129; 130; 131
Ovulo	161	<i>Populus ? canadensis</i>	129
Pacciamatura	161	<i>Populus alba</i>	129; 130
<i>Paeonia</i>	91	<i>Populus balsamifera</i>	129
paesaggio	27	<i>Populus coreana</i>	129
<i>Paliurus spina-christi</i>	119	<i>Populus deltoides</i>	129
<i>Pancratium maritimum</i>	43; 72; 104; 105; 142	<i>Populus euphratica</i>	129
Pappo	161	<i>Populus grandidentata</i>	129
parafilm	82	<i>Populus heterophylla</i>	129
parassiti	45; 57; 59; 81; 160; 164	<i>Populus lasiocarpa</i>	129
Parassitismo	161	<i>Populus laurifolia</i>	129
<i>Parietaria</i>	47	<i>Populus maximowiczii</i>	129
Partenocarpia	162	<i>Populus nigra</i>	127; 128; 130; 133
Partenogenesi	162	<i>Populus simonii</i>	129
<i>Pastinaca sativa</i>	41		
patogeni	64; 97; 162; 166		
Pedologia	162		
percentuale di germinazione	104		
pericarpo	42		

<i>Populus tremula</i>	129; 130	radichetta	63; 87; 90; 97; 102; 157; 158; 162; 166
<i>Populus tremuloides</i>	129	raggrinzimenti	67
<i>Populus trichocarpa</i>	129	<i>Ramet</i>	164
<i>Populus yunnanensis</i>	129	Range ecologico	164
portainnesto	130	<i>Ranunculus</i>	147
<i>Posidonia oceanica</i>	48; 142	rarietà	17; 18; 34; 39
Postmaturazione	58; 104; 159; 163	Recupero post-congelamento	75; 76
Potenziale idrico	163	REDBAG	31
prechilling	95. Vedi Stratificazione fredda	<i>regioni di provenienza</i>	23; 24; 38
<i>preheating</i>	Vedi Stratificazione calda	reintroduzione	22; 23; 26; 32; 34; 78
prelavaggio	97	Resilienza ecologica	164
pretrattamenti	109	Resistenza ecologica	164
pretrattamento	53; 75; 77; 78; 87; 90; 91; 95; 108; 109; 146; 163; 169	respirazione	61; 66
prima pulizia	58; 61	RGB	137; 140; 152; 164
processi metabolici	61; 74	<i>Rhamnus</i>	121; 143; 144
propagazione	18; 19; 23; 32; 38; 40; 78; 84; 85; 86	<i>Rhamnus alaternus</i>	143; 144
propagazione sessuale	108; 124	<i>Rhododendrum</i>	85
Propagazione vegetativa	147; 163	<i>Rhus</i>	85
Propaggine	163	<i>Ribes</i>	84
propaguli	40	<i>RIBES</i>	30; 31
proteine LEA	66	<i>Ribes sardoum</i>	46
protocolli di germinazione	34; 43; 44; 55; 163	rigenerazione	19; 40; 44; 57; 73; 78
prova del taglio	42; 43; 56; 59	rimboschimenti	38; 39
Prova di conducibilità	64; 164	Rinaturalizzazione	164
<i>Prove di vigore</i>	65	Rinaturazione	164
Provenienza	164	riposo vegetativo	39; 85; 164
<i>Prunus</i>	85; 90	ripristino ambientale	37
<i>Prunus brigantina</i>	120	riproduzione incrociata	36
<i>Prunus amygdalus</i>	120	Riproduzione sessuale	148; 165
<i>Prunus avium</i>	120	riserve genetiche primarie	127
<i>Prunus cerasifer</i>	120	<i>Risonanza magnetica</i>	64
<i>Prunus cerasus</i>	120	risorse genetiche	17; 22; 27; 28; 31; 33; 37; 127
<i>Prunus laurocerasus</i>	120	ritardo di germinazione	104; 165
<i>Prunus mahaleb</i>	120	rizomi	39; 84; 165
<i>Prunus padus</i>	120	<i>Robinia pseudoacacia</i>	90
<i>Prunus spinosa</i>	120	Rocciosità	165
Psammofila	164	<i>Rosa</i>	84; 85; 121
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	167	<i>Rosaceae</i>	85; 91; 124; 126
pulizia	43; 52; 55; 56; 58; 59; 60; 61; 162; 165; 191	<i>Rosmarinus</i>	85
Purezza del seme	164	<i>Rubus</i>	85
<i>Pyrus pyraeaster</i>	121	<i>Ruscus aculeatus</i>	122
<i>Pyrus spinosa</i>	121	saccarosio	48; 50; 76; 77; 78
quarantena	37; 57; 164	Sacchetti in polietilene	70
<i>Quercus</i>	39; 66; 76; 77; 121; 166	saggio di conducibilità	65
<i>Quercus ilex</i>	39	<i>Salicaceae</i>	84; 85; 86; 127; 128; 132; 205
<i>Quercus robur</i>	76	<i>Salix</i>	84; 124
<i>Quercus suber</i>	169	<i>Salix alba</i>	130
raccoglitori	X; 19; 39; 41; 53; 55	Samara	165
raccolta	X; 17; 18; 19; 21; 24; 26; 34; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 49; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 62; 73; 84; 85; 86; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 111; 112; 113; 114; 117; 118; 120; 121; 122; 123; 127; 128; 131; 132; 133; 147; 148; 150; 159; 163; 166; 167	<i>Sambucus</i>	122
		<i>Santolina</i>	85
		<i>Sapotaceae</i>	66
		<i>Saxifraga bulbifera</i>	150
		<i>Saxifragaceae</i>	73
		Scapi fiorali	165
		scarificazione	90; 96; 97; 99; 100; 102; 109; 113; 114;

115; 117; 120; 122; 165	Stame	166
Scarificazione	<i>Staphylea pinnata</i>	122
Schizocarpo	Stato fitosanitario	53; 166
Sciafila	stato sanitario	23; 53
Sclerofille	Stazione	19; 36; 40; 44; 46; 166; 179
<i>Scrophulariaceae</i>	stazioni	36
segregazione	Stilo	167
selezione	Stimma	167
selvicoltura naturalistica	Stoccaggio	152; 167
seme artificiale	Stoloni	167
semenzai	Stratificazione	95; 151; 167
semenzali	<i>Stratificazione calda</i>	95; 109; 155; 163; 167; 170
semi ...17; 18; 19; 23; 24; 31; 32; 34; 36; 37; 38; 39; 40;	<i>Stratificazione fredda</i>	95; 109; 115; 151; 167; 170
41; 42; 43; 46; 47; 48; 49; 50; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58;	Strobilo	156; 168
59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 70; 71; 72; 73; 74;	Strofiolo	168
75; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 87; 88; 90; 91; 92; 93;	strutturali	19; 34; 86
95; 96; 97; 99; 101; 102; 103; 104; 106; 107; 108; 109;	substrato ..38; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 85; 87; 95; 97; 98;	101; 102; 121; 129; 131; 132; 151; 154; 167
110; 112; 113; 116; 123; 124; 125; 126; 127; 130; 131;	Successione	168
132; 133; 134; 136; 137; 139; 141; 142; 143; 144; 145;	Suffrutice	168
146; 147; 148; 149; 150; 151; 152; 153; 154; 155; 156;	suolo	36; 41; 45; 47; 53; 54; 66; 82
157; 158; 159; 161; 162; 163; 164; 165; 166; 167; 168;	superaffreddamento	74
169; 170	sviluppo sostenibile	23
semi intermedi	<i>Sylibum marianum</i>	143
semi ortodossi	<i>T50</i>	103; 104; 168
semi pregerminati	talee37; 38; 43; 84; 85; 86; 107; 127; 128; 129; 149;	163; 168
semi recalcitranti	talee di gemme fogliari	85
semina .17; 61; 78; 79; 80; 81; 82; 91; 95; 96; 100; 102;	talee erbacee	84
108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118;	talee legnose	84
119; 120; 121; 122; 123; 125; 166; 198	<i>Tamarix</i>	84
Semina	<i>Taraxacum</i>	142
serre	Tasso di mortalità	168
setacci	Tasso di natalità	168
<i>Shorea</i>	Tavola densimetrica	168
<i>Silene cambessedesii</i>	<i>taxon</i> 25; 36; 37; 40; 43; 44; 47; 56; 57; 58; 79; 81; 83; 87	99; 101; 134; 147; 153; 154; 168; 169
<i>Silene diclinis</i>	<i>Taxus</i>	85; 148
Simbionti	<i>Taxus baccata</i>	123
<i>Smilax aspera</i>	tegumenti.59; 61; 62; 64; 67; 73; 87; 88; 90; 92; 95; 96;	97; 99; 102; 131; 142; 161; 165; 166; 167; 168; 169
<i>Solanaceae</i>	temperatura...48; 50; 51; 52; 58; 60; 62; 65; 68; 71; 72;	73; 74; 75; 76; 78; 79; 81; 83; 85; 87; 88; 89; 91; 95; 96;
somatici	97; 98; 101; 104; 105; 106; 108; 125; 126; 129; 131;	132; 133; 155; 158; 167; 168; 169
<i>Sonchus</i>	Temperatura ottimale	168
<i>Sorbus</i>	Tempo medio di Germinazione (TMG)	168
<i>Sorbus aucuparia</i>	Termobilancia	168
sostanze fenoliche	Termoperiodo	168
sostanze inibitrici	Termotipo	168
<i>Spartium junceum</i>	Terofite	168
specie agricole	tessuti17; 18; 42; 61; 63; 64; 65; 66; 72; 73; 74; 75; 76;	77; 92; 127; 129; 130; 149; 151; 156; 158; 162; 164; 165;
specie aliena	169	
Specie alloctona	Tessuti meristematici	168
specie esotiche		
specie forestali		
specie geocore		
<i>spedizione</i>		
Spermatofite		
spolpatura		
spore		

Test a freddo	169	71; 72; 73; 74; 77; 83; 84; 170	
test colorimetrico	63; 64; 92; 158		<i>Vitex agnus-castus</i>91
test di germinazione...19; 41; 43; 57; 58; 59; 63; 73; 88; 95; 99; 106; 131			<i>Vitis</i>84
test di vitalità	42; 59; 74; 92		vittrificazione.....73; 74; 76; 78
Testa.....	169		vivai.....25; 38; 81; 84
Tetrachenio	169		vivipari.....66
tetradi	49		vulnerabilità.....17; 18; 39
<i>tetrazolio</i>	63; 64; 92; 132; 169		<i>Vulpia</i>143
Tetrazolio	169		warming <i>Vedi</i> Stratificazione calda
<i>Teucrium dunense</i>	81		<i>Xanthium strumarium</i>143
<i>Teucrium dunense</i> Sennen	81		Xerofita.....170
<i>Teucrium lepicephalum</i>	82		Zigote
<i>Tilia</i>	123; 142		170
Tipo corologico.....	169		<i>Zoocoria</i>142; 170
Tomografia assiale computerizzata (TAC)	169		
topofisi	84		
Topofisi.....	169		
Torba.....	169		
trattamento antimicotico	102		
Trattamento del seme.....	169		
<i>Trifolium subterraneum</i>	142		
<i>Trillium</i>	143		
TTC <i>Vedi</i> Tetrazolio. <i>Vedi</i> Tetrazolio. <i>Vedi</i> Tetrazolio			
Tubercolo	169		
tuberi	84; 169		
<i>Tulipa</i>	88		
<i>Tussilago farfara</i>	143		
<i>Ulmus</i>	85; 123; 124		
ultradeidratazione	72		
umidità interna.....	52; 57; 61; 67; 68		
umidità relativa....48; 50; 52; 58; 67; 68; 70; 71; 75; 83; 84; 169			
umidità relativa all'equilibrio	68		
UNEP	26		
uniformità genetica	38		
Unisessuale	169		
unità tassonomiche	X; 18; 78; 79; 169		
vagliatrice	60		
validazione.....	43		
Validazione dei protocolli	170		
variabilità genetica18; 36; 37; 38; 39; 40; 44; 84; 95; 108; 127; 128; 130; 163; 170			
variabilità intraclonale	128		
varietà	17; 30; 76; 170		
velocità di germinazione.....	63; 88; 103		
vermiculite.....	81; 86; 167		
vernalizzazione.....122. <i>Vedi</i> Stratificazione fredda			
via agamica	84		
vials	71; 75		
<i>Viburnum</i>	85; 123; 124		
vigore.....	24; 65; 103; 128; 167; 169; 170		
<i>Viola</i>	143		
Viraggio	170		
vitalità 19; 24; 43; 49; 50; 51; 53; 57; 58; 60; 62; 63; 64;			

