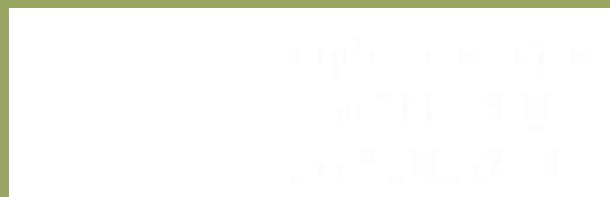


Population reinforcement of European terrestrial orchids



Prof. Simon Pierce

Department of Agricultural and Environmental Sciences – Production, Landscape, Agroenergy
simon.pierce@unimi.it



Collaborators/Projects



LIFE14 IPE/IT/000018,
LIFE IP GESTIRE 2020 Nature Integrated Management to 2020. Regione Lombardia.
Ente Regionale per I Servizi all'Agricoltura e alle Foreste (ERSAF)
<https://naturachevale.it/gestire/it/index.html>

Special mention:

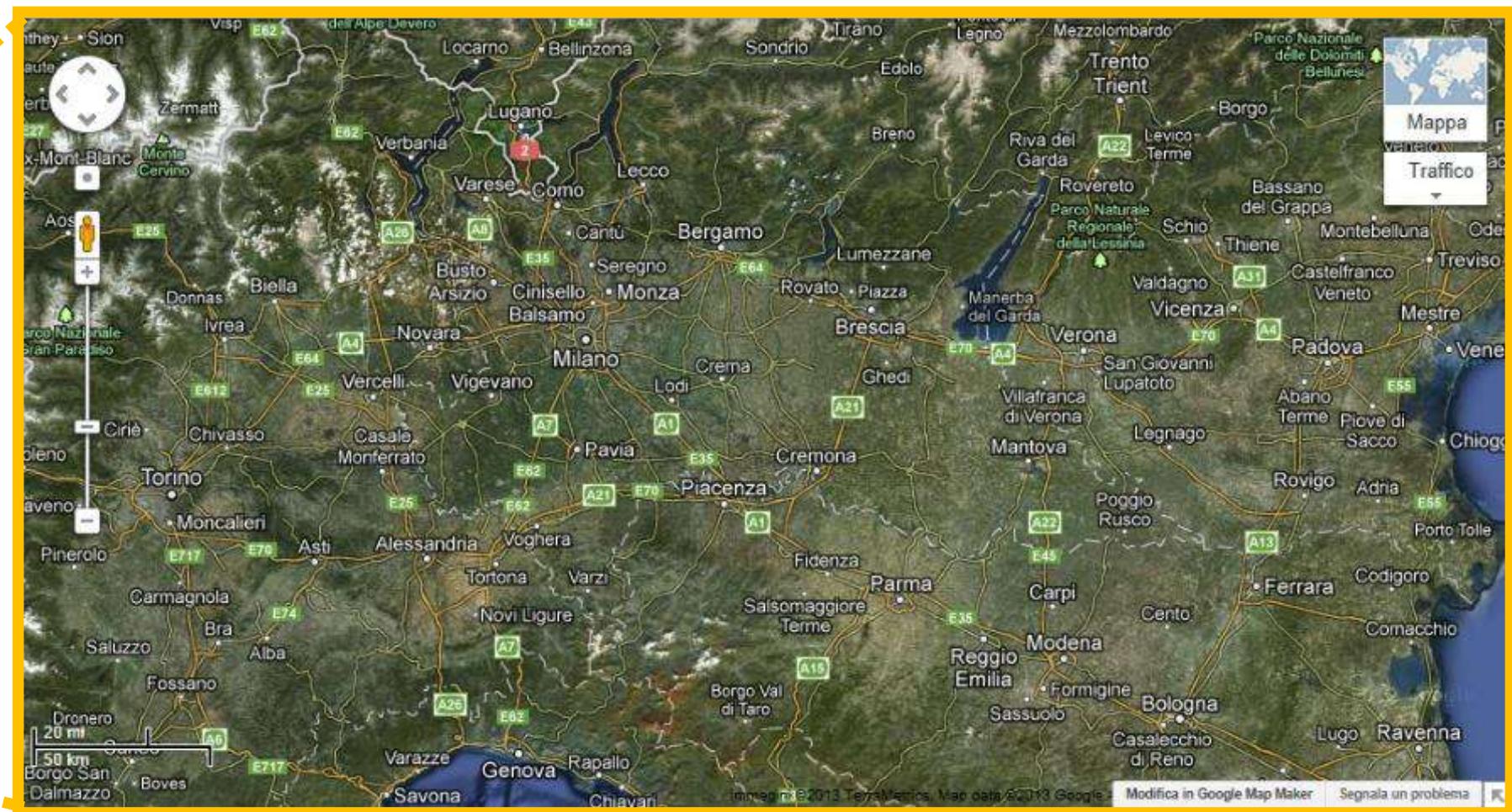
Pierfranco Arrigoni



Gianantonio Leoni



Project areas



The importance of habitat conservation for recruitment and seedling survival

Habitat conservation is fundamental, but sometimes populations may be small even in suitable habitat

**Population
reinforcement =
'Assisted recruitment'**



Chalicodoma parietina

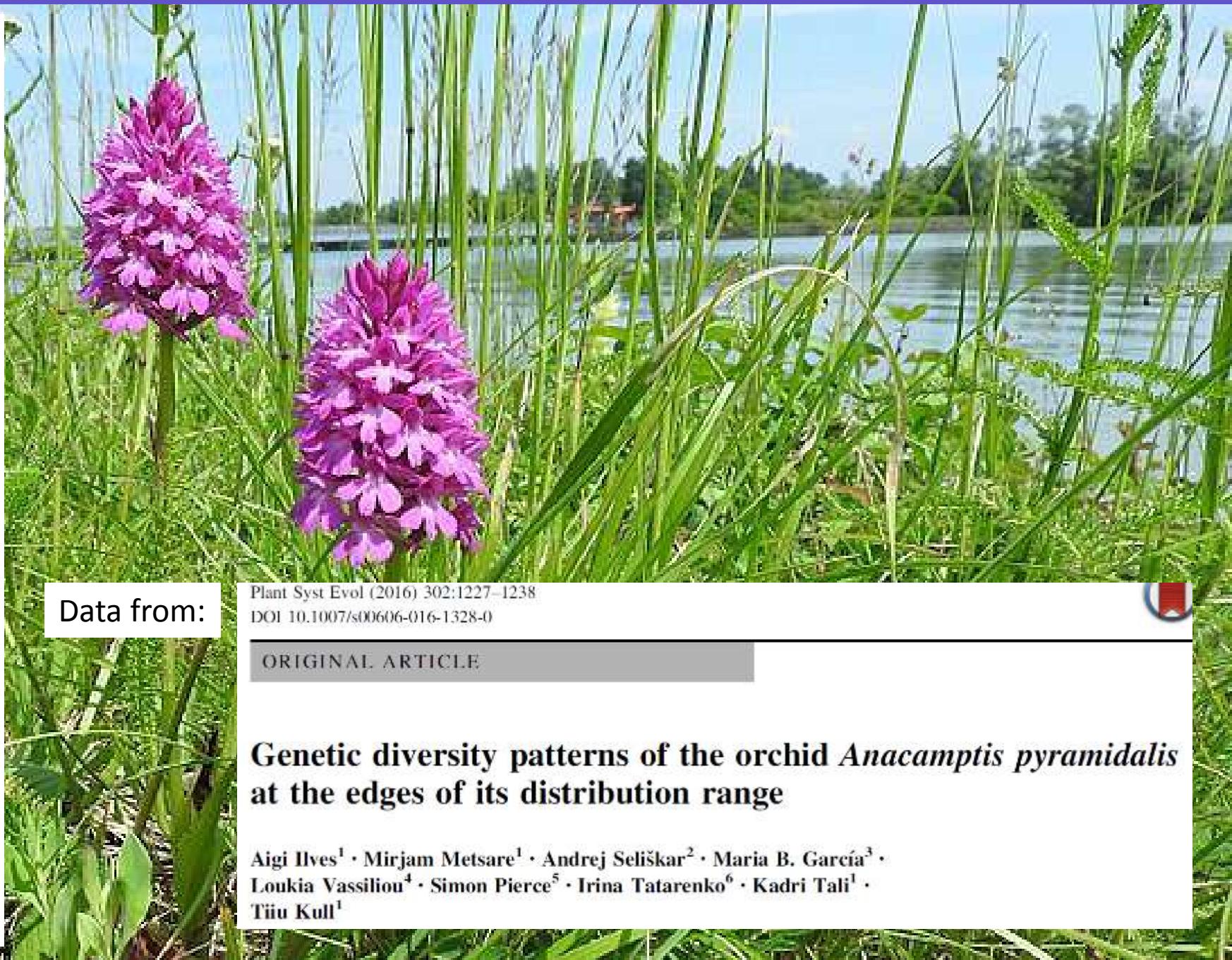
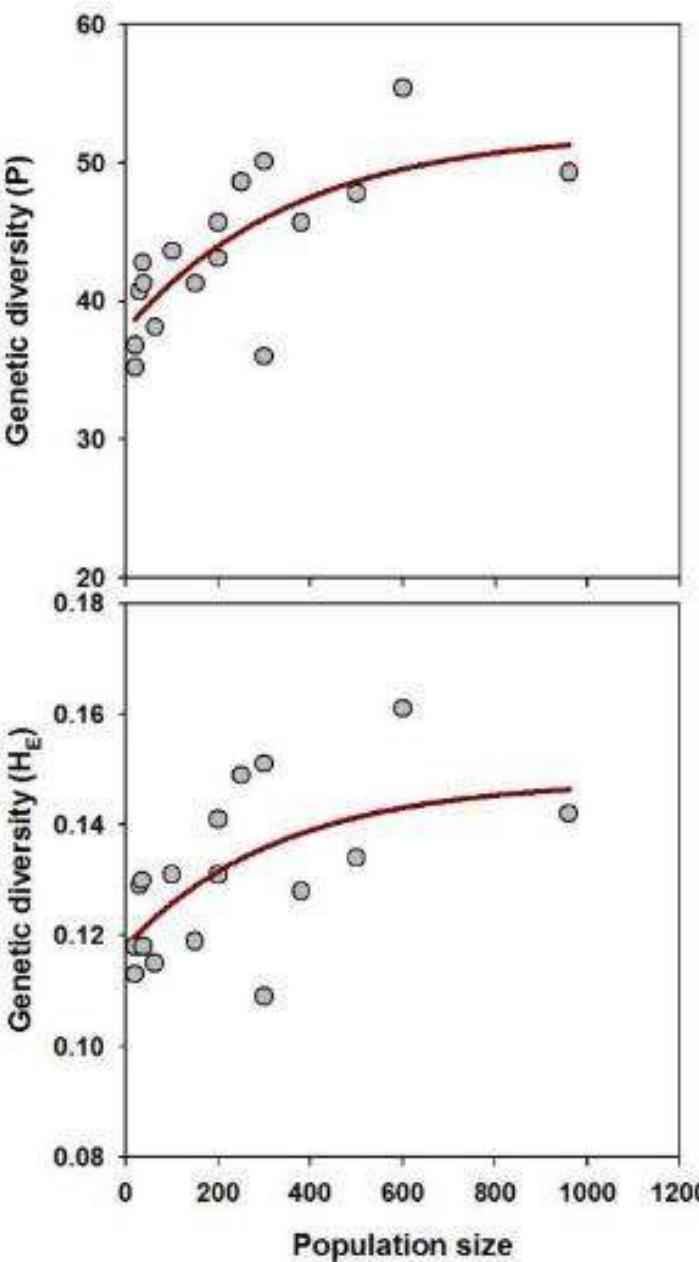


Ophrys benacensis

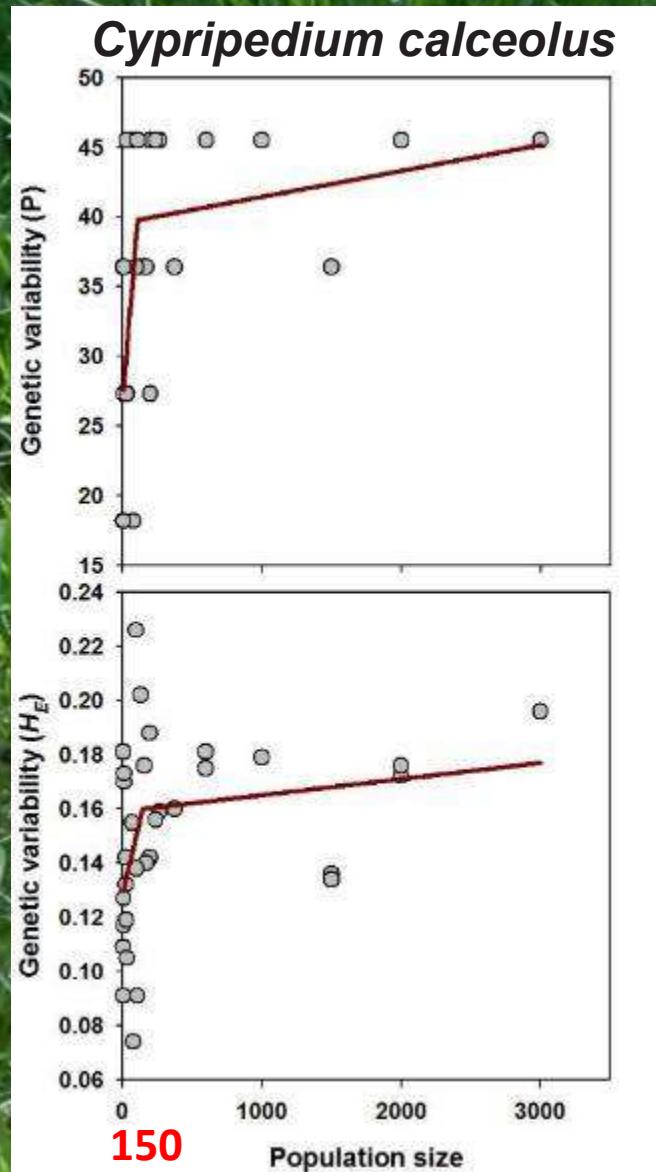


Ophrys sphegodes

Population size and genetic diversity



Population size and genetic diversity



Population reinforcements from ex-situ (*in vitro*) seed germination



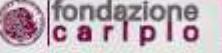
A total of 14 species were reproduced from seed and used to reinforce wild populations

10,145 plants were returned to the wild

Anacamptis morio, A. pyramidalis, Coeloglossum viride, Dactylorhiza traunsteineri, Goodyera repens, Gymnadenia conopsea, G. odoratissima, Nigritella nigra ssp. rhellicani, Orchis provincialis, Ophrys apifera, O. benacensis, O. sphegodes, Pseudorchis albida, Serapias vomeracea



The Conservation of the Native Orchids of Lombardy



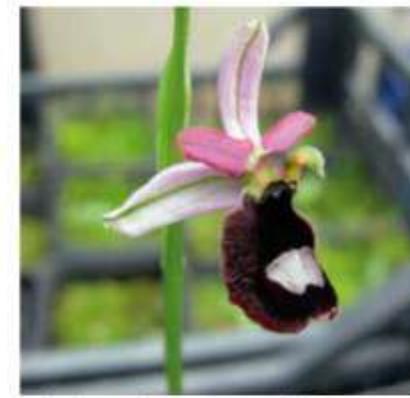
ALAO



Plants of *O. bonaconsis* growing during the winter (photo 5, Pierce)



A three-year old plant of *O. benacensis*, ready for transplantation into the wild (photo S. Pierce)



Ophrys bonacensis flowering in captivity for the first time in the world; at the CTA in April 2010 (photo S. Pierce)



Ophrys sphenoides produced from seed, flowering at the CFA
(photo S. Pierce)

In 2006, we have nonetheless been able to produce enough plants to substantially increase the original population and also re-establish populations that have previously disappeared – over 75 mature plants of this extremely rare species were produced and used to reinforce the population of Monte Barro.



Ophrys tenthredinifera returned to the wild at Parco Monte Bano (photo S. Pierce)



Esperienze di Conservazione delle Orchidee

a cura di
Sara MAGRINI, Monica FONCK e Laura ZUCCONI

2014



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

Simon Pierce¹ e Roberta M. Ceriani²

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

Le popolazioni di orchidee sono sottoposte a due principali tipi di minacce, la perdita di habitat e la raccolta di esemplari. La prima è rivolta indiscriminatamente a tutte le specie, mentre la seconda rappresenta una minaccia specifica rivolta solo a orchidee particolarmente vistose che vengono raccolte per ignoranza o interessi di specie attraverso apposite normative, la conda interventi mirati di tutela degli habitat e rafforzamento mediante propagazione *ex situ*. Esempi di presentati nel presente articolo.

Le orchidee dei prati e dei pascoli sono piante per catturare abbastanza energia per portare a termine i loro cicli vitali (Presti et al., 2001; Dorland & Willems, 2006; Jacquemyn et al., 2008). I periodi di freddi dopo che la vegetazione circostante è stata coltivata o disboscata incrementano la biodiversità, mentre gli arbusti invadono i prati riducendo l'energia disponibile per le orchidee. Alcune specie. Ai giorni nostri lo sfruttamento dell'ambiente naturale è sempre meno frequente, con conseguenze negative per il mantenimento del habitat: la conservazione degli habitat di tipo terriero locali che continuano ad operare se ne traggono vantaggi. Nel Parco del Monte Barro, vicino a Lecco, i prati esistenti rappresentavano in passato un'agricoltura di sussistenza per la produzione lattiera e casearia. Le orchidee oggi sopravvivono essenzialmente grazie alla caccia di conigli e pollame sia prevalente. Il Parco e i piccoli proprietari solitamente praticano una siccatura relativamente bassa, spesso ad un'altezza di circa 7 cm dal suolo, usando una combinazione di

Fig. 5. Rafforzamento delle popolazioni di Ophrys sul Monte Barro nel 2010: si vedi commenti riportati ai tre anni di O. apifera; c) ripianto di tuberi di O. benacensis da parte di un volontario, rispetto di O. benacensis (d) e O. apifera (e) nell'autunno successivo (Foto S. Pierce).

operai (uds) rispettivamente.

Nel Parco del Monte Barro, questo tipo di intervento ha portato al ripopolamento di O. apifera moltiplicando la popolazione originaria di 15 volte rispetto alla consistenza originaria (Pierce et al., 2013; Fig. 5a); mentre piante di O. sphacelata prodotte in vitro sono state usate per le realizzazioni didattiche aperte al pubblico (Fig. 1b). Complessivamente 175 piante di O. benacensis sono state immesse in natura: 35 di queste sono fiorite nel 2013, cinque anni dopo le semine in vitro (Fig. 5c,d). La popolazione naturale di questa rara specie endemica era costituita da solo 10 individui: l'intervento ha quindi comportato la moltiplicazione della popolazione principale di ben 12 volte.



Orchidee d'Italia

GUIDA ALLE ORCHIDEE SPONTANEE

SECONDA EDIZIONE
INTERAMENTE AGGIORNATA

2016



IL CASTELLO

CONSERVAZIONE DELLE ORCHIDEE

Sara Magrini & Simon Pierce

Le attività per la conservazione delle orchidee ricadono in due categorie principali, come previsto dalla Convenzione sulla Conservazione della Diversità Biologica (CBD), adottata nel 1992 a Rio de Janeiro e ratificata dallo Stato italiano nel 1994: la conservazione *in situ* (principalmente protezione legale e conservazione degli habitat) e la conservazione *ex situ* (che riguarda la conservazione di piante, semi e polline al di fuori dell'ambiente naturale). Due approcci che, pur essendo indipendenti, non sono antitetici ma, anzi, devono essere complementari per la conservazione della diversità genetica e degli organismi rispettivamente all'interno e al di fuori dei loro ambienti naturali. Una concezione moderna della biodiversità deve quindi prevedere attività *in situ* ed *ex situ*, con una connivenza e trasversale.

La conservazione *in situ*

La conservazione degli habitat è fondamentale per la conservazione delle orchidee.



Figura 58

molti più ampi che storicamente ricoprivano tutta l'area, utilizzati per fornire il fieno per il bestiame per la produzione lattona e casearia; quindi, in sostanza, dove continuano le attività tradizionali le orchidee di prati e pascoli persistono. Così, uno dei fattori più importanti per il futuro di questi pascoli e delle orchidee che vi vivono può essere semplicemente la volontà della prossima generazione di promettere fermi di continuare con la tradizionale produzione alimentare a piccola scala e con la tradizionale gestione del terreno. In alcune aree dove vivono piccole popolazioni di specie endemiche o particolarmente rare, poiché queste possono prendere decisioni che riguardano il futuro di intere specie, e, a volte, gli agroecologi fanno strette consapevoli per proteggere fiori che trovano interessanti o belli.

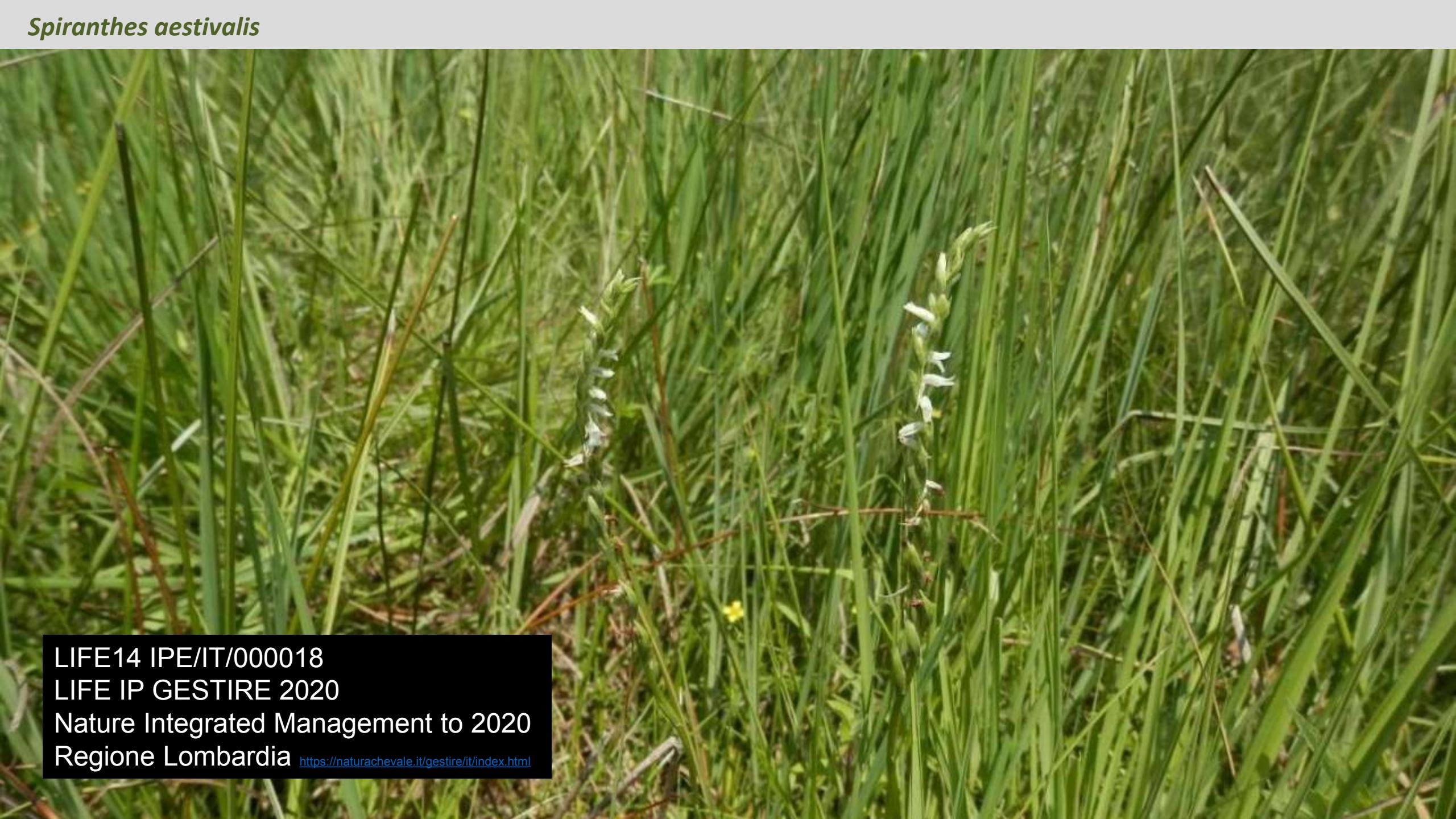
merciali e protegge indirettamente le orchidee riducendo il mercato per la vendita di piante raccolte in natura. Strumenti di protezione legale come questo sono importanti, ma agiscono limitando la perdita di piante mentre fanno poco per garantire il futuro dei loro habitat o tantomeno per aumentare la disponibilità di habitat idonei. In Europa, la più importante protezione in questo ambito è fornita dalla cosiddetta Direttiva "Habitat" (Direttiva del Consiglio n. 92/43/CEE "Conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche") che, nonostante indichi solo 5 specie di orchidee italiane come di interesse comunitario, cioè *Cypripedium calceolus*, *Iparis loeselii*, *Ophrys elenae* e *Ophrys apifera* (elencate negli Allegati I, II e III a fornire protezioni specifiche a quei siti), per le orchidee. Così, il Consiglio europeo ha designato una rete europea per la conservazione delle orchidee, cioè il "Network Europeo per la conservazione delle orchidee".

Per definizione, non esistono siti di pascolo che bastano perché è proprio questo che impedisce l'invasione delle specie legnose che, inoltre, renderebbe molto più difficile anche la sopravvivenza delle orchidee. Quindi, a molti fatti, le orchidee beneficiano del pascolo, nonostante gli occasionali effetti negativi. In del milba, quando qualcuno compra il formaggio prodotto in questa zona sta sostenendo una forma di gestione degli habitat che garantisce benefici diretti per la conservazione delle orchidee. Purtroppo i pascoli possono, in casi estremi, diventare più di 80 specie vegetali per ettaro quadrato e sono importanti fondamentali per la conservazione della biodiversità vegetale in generale. Forse una strada utile per la futura conservazione potrebbe essere quella di promozionare il collegamento tra il consumo di prodotti tipici locali e la salvaguardia della biodiversità e inserire questa informazione esplicitamente sull'etichetta degli alimenti, perché questo tipo di conservazione dipende molto dalla sensibilizzazione dei cittadini e, in particolare, dalla connivenza dei produttori e consumatori locali.

Oltre alla tutela giuridica e alla gestione degli habitat, un altro aspetto della conservazione *in situ* consiste nel fornire ad alcune specie di orchidee un "aiuto" per la riproduzione aumentando la produzione di semi, uno strumento questo che può essere importante anche per la successiva propagazione e coltivazione *ex situ*. L'impollinazione manuale comprende il trasferimento in polvere da un fiore all'altro e utilizza la tecnica che Charles Darwin aveva originariamente utilizzato per capire come le mosse polliniche fossero coinvolte nel meccanismo di impollinazione delle orchidee. In particolare, uno strumento, un ago o un altro oggetto lungo e sottile viene inserito nel fiore e utilizzato per prendere i pollini e portarli in un secondo fiore (fig. 59). Uno dei modi più sem-

Critical phase 1: Finding plants and obtaining seed

Spiranthes aestivalis

A close-up photograph of tall, green grass blades. Two small, light-colored, spiraling flower spikes of the orchid species *Spiranthes aestivalis* are visible, one on each side of the center. The background is filled with more green grass.

LIFE14 IPE/IT/000018
LIFE IP GESTIRE 2020
Nature Integrated Management to 2020
Regione Lombardia <https://naturachevale.it/gestire/it/index.html>

Liparis loeselii



LIFE14 IPE/IT/000018
LIFE IP GESTIRE 2020
Nature Integrated Management to 2020
Regione Lombardia <https://naturachevate.it/gestire/it/index.html>

Cypripedium calceolus

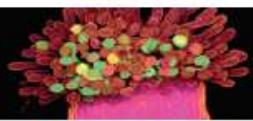


LIFE14 IPE/IT/000018
LIFE IP GESTIRE 2020
Nature Integrated Management to 2020
Regione Lombardia <https://naturachevale.it/gestire/it/index.html>

Himantoglossum adriaticum



LIFE14 IPE/IT/000018
LIFE IP GESTIRE 2020
Nature Integrated Management to 2020
Regione Lombardia <https://naturachevale.it/gestire/it/index.html>



RESEARCH PAPER

Increasing the germination percentage of a declining native orchid (*Himantoglossum adriaticum*) by pollen transfer and outbreeding between populations

S. Del Vecchio¹ , S. Pierce² , E. Fantinato¹  & G. Buffa¹ 

1 Department of Environmental Science, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University, Venice, Italy

2 Department of Agricultural and Environmental Sciences (DiSAA), University of Milan, Milan, Italy

Keywords

Conservation; cross-pollination; dry grasslands; isolation; population size.

Correspondence

S. Del Vecchio, Department of Environmental Science, Informatics and Statistics, Ca' Foscari University, Venice, Italy.

E-mail: silvia.delvecchio@unive.it

Editor

H. Pritchard

ABSTRACT

- The declining native orchid *Himantoglossum adriaticum* H. Baumann, endemic of priority interest (92/43/ EEC, Annex II). Northern Italian *H. adriaticum* are small and isolated, with depressed seed set. Given implications for plant population conservation, we tested the hypotheses of pollen transfer (hand-pollination) and outbreeding between populations, fruit set and seed germination percentage.
- The background fruit set and *in vitro* germination rates were determined for reference populations. An artificial cross-pollination experiment included (a) pollen transfer from one large population to two small and isolated populations; (b) pollen transfer between two small but not isolated populations; (c) within-population pollen transfer.

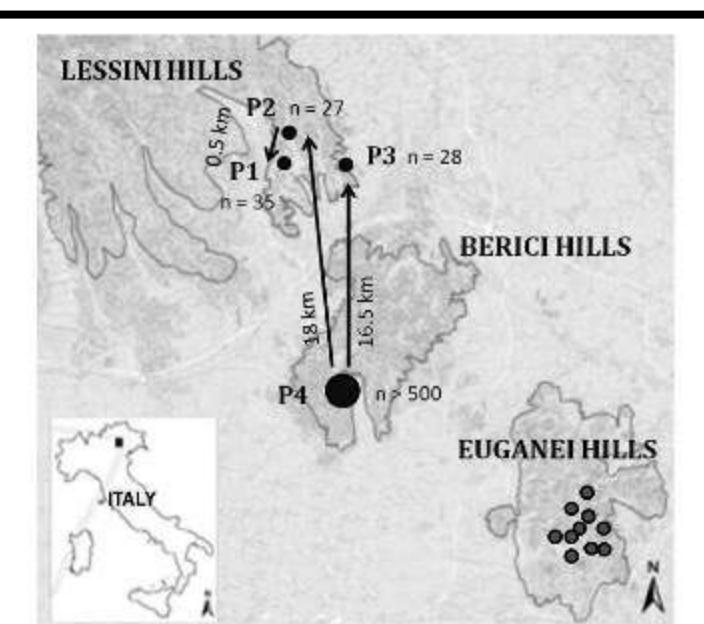


Fig. 1. Study area and sampling design. The arrows indicate the pollen transfer for the cross-pollination experiment, while 'n' indicates the number of shoots in each population. Dark grey populations were used for the outbreeding experiment; light grey populations were used as the reference populations to investigate the background germination capacity of *Himantoglossum adriaticum*.

Himantoglossum adriaticum



Himantoglossum adriaticum



Critical phase 2: Germination

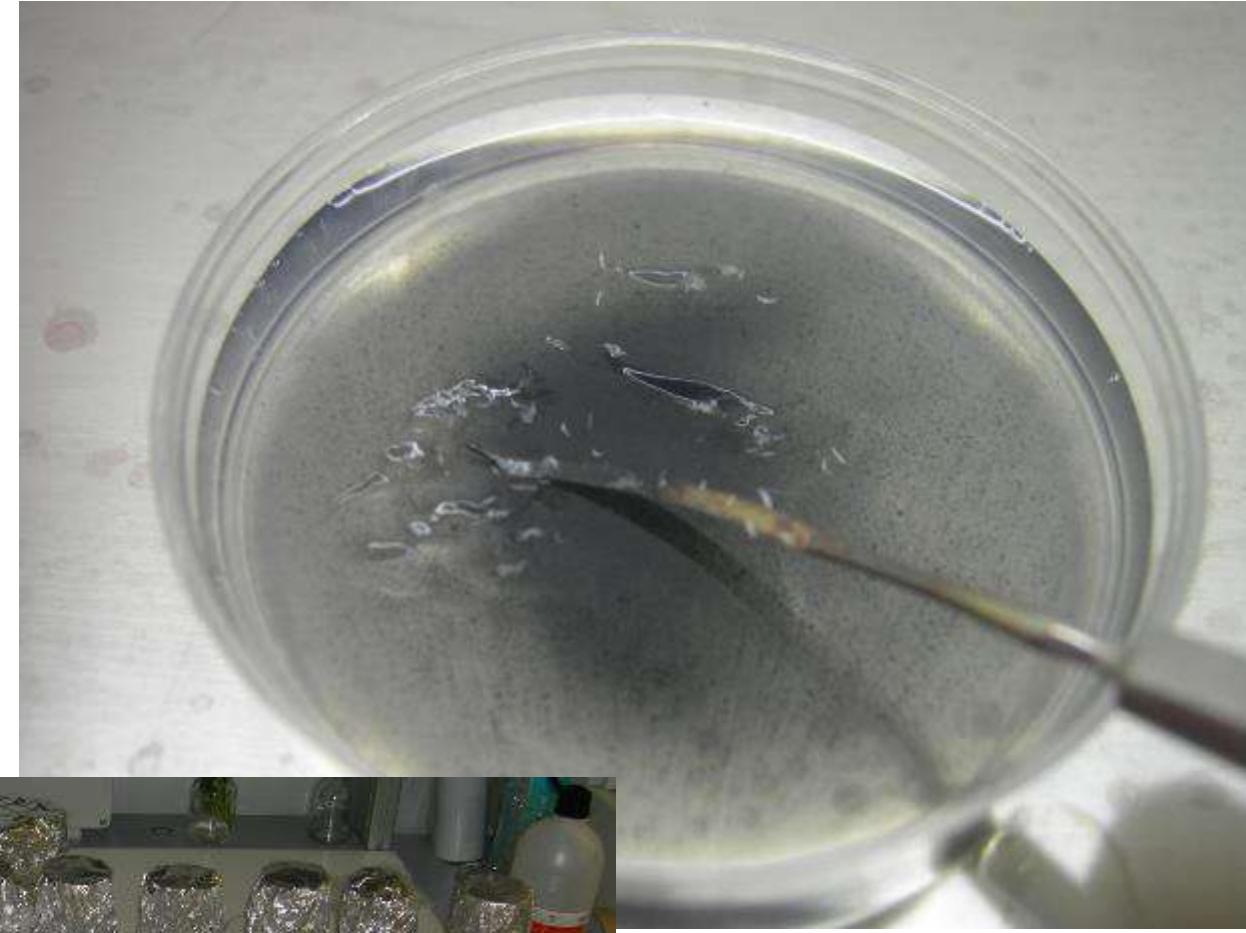




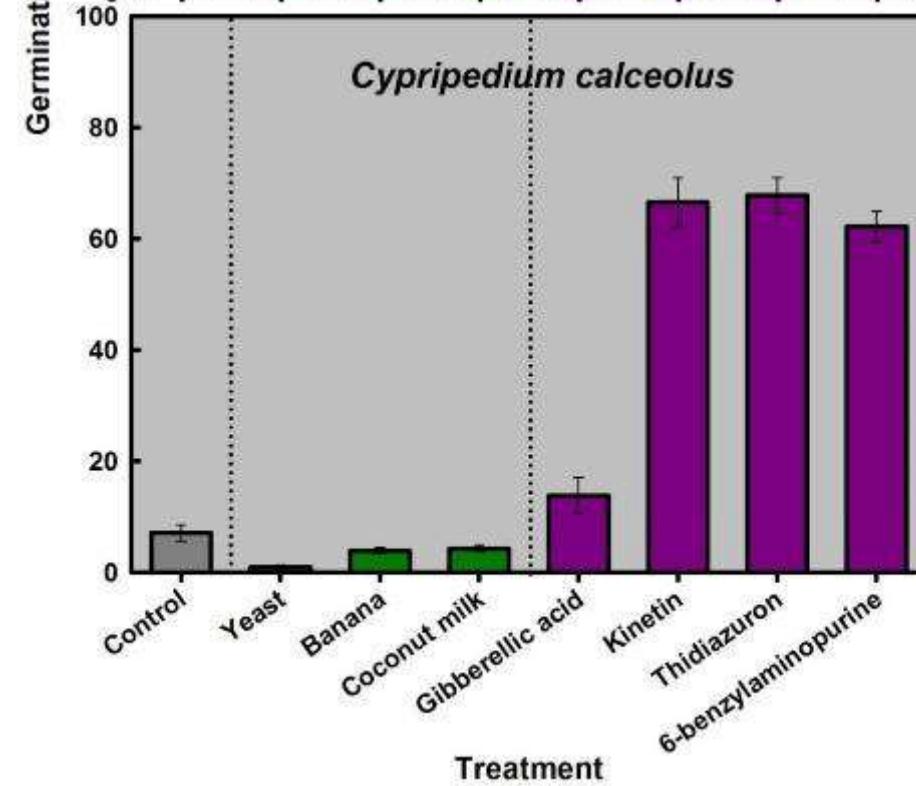
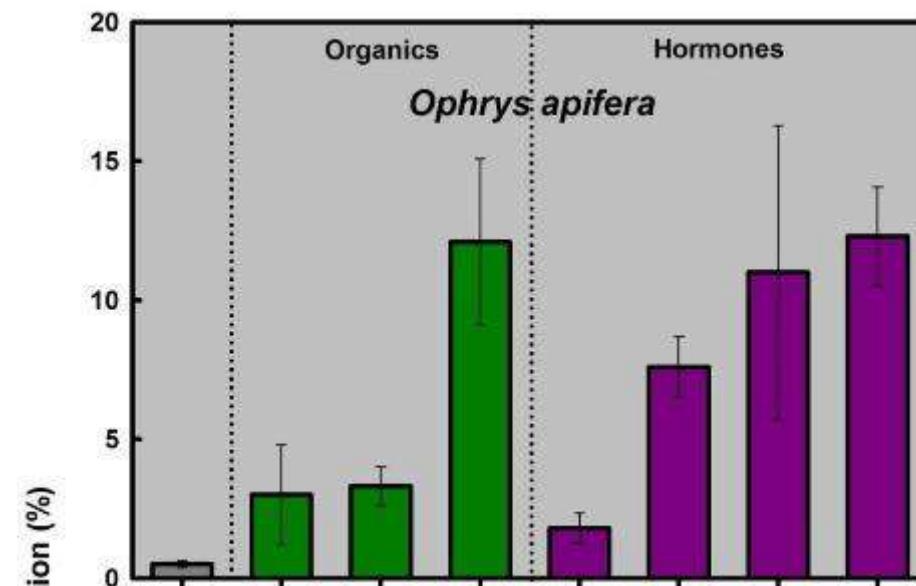
Ramsay & Stewart (1998) Bot. J. Linn. Soc. 126(1-2): 173–181



Cypripedium calceolus



Cypripedium calceolus



Research Note

Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones

S. PIERCE AND B.E.L. CERABOLINI



105 plants used for population reinforcement
in 2011

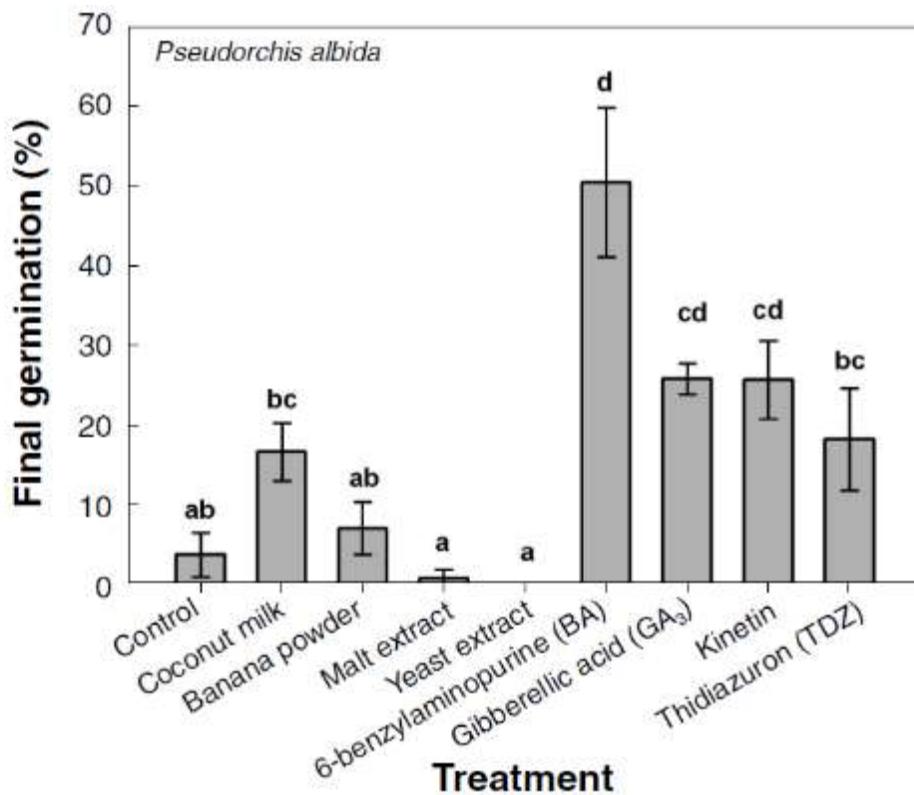
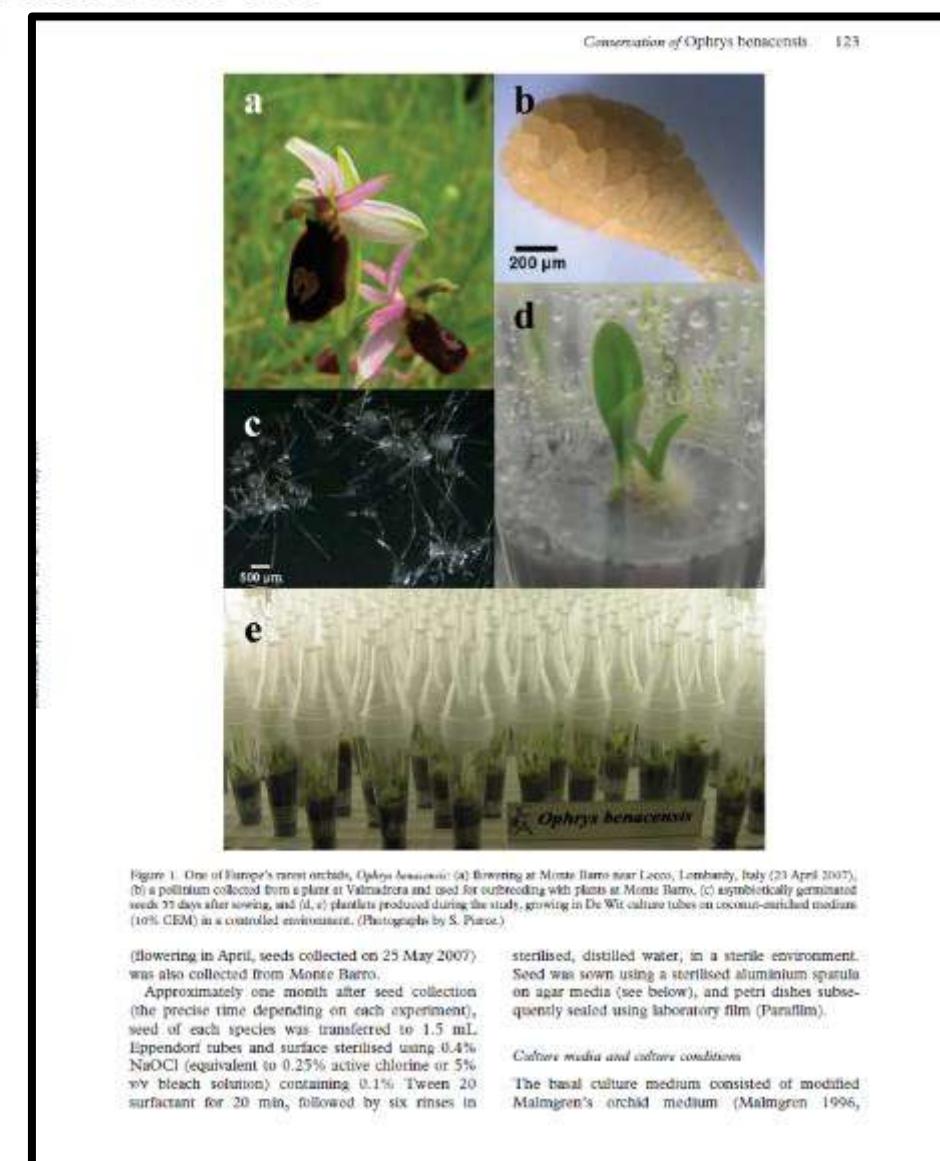
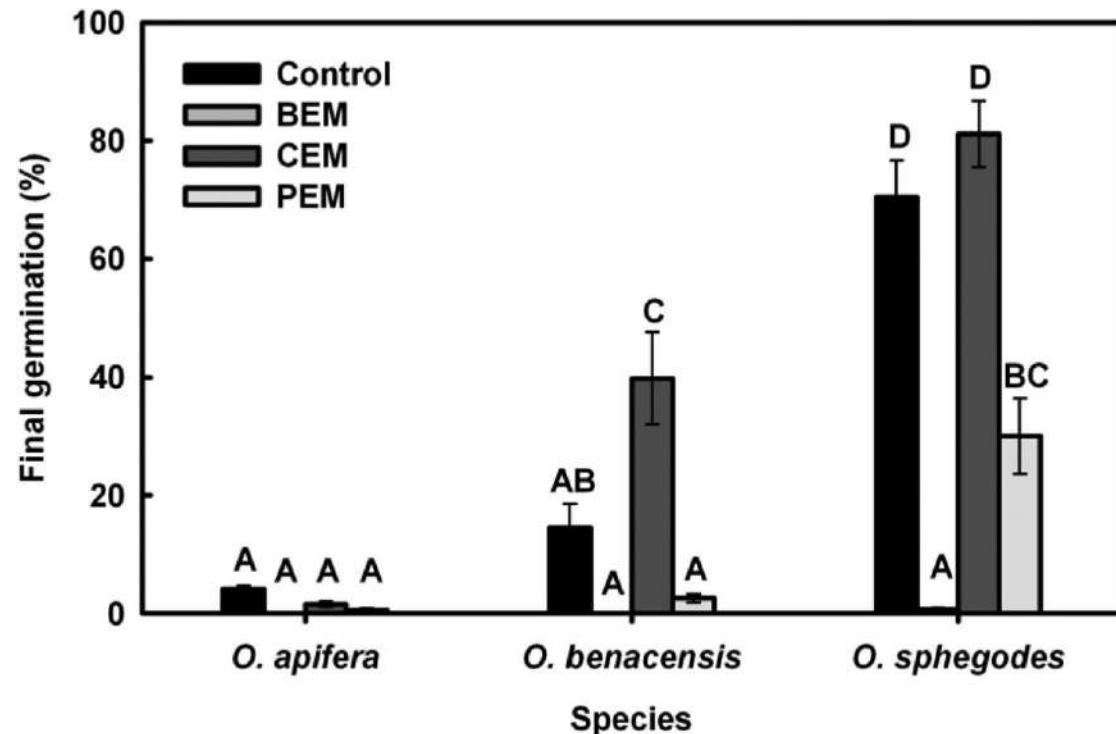


Figure 1. Final germination percentages of immature *Pseudorchis albida* seed on basal medium (control), basal medium plus complex organic media (coconut milk, banana powder, malt extract and yeast extract; 5%) and basal medium plus phytohormones (6-benzylaminopurine, gibberellic acid, kinetin, thidiazuron; 20 mg L⁻¹). Values represent the mean \pm 1 S.E. of five replicates. Different letters indicate significant differences between means (ANOVA and Tukey's multiple comparison procedure).

Outbreeding and asymbiotic germination in the conservation of the endangered Italian endemic orchid *Ophrys benacensis*

S. PIERCE, A. FERRARIO, & B. CERABOLINI



(flowering in April, seeds collected on 25 May 2007). was also collected from Monte Barro.

Approximately one month after seed collection (the precise time depending on each experiment), seed of each species was transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and surface sterilised using 0.4% NaOCl (equivalent to 0.25% active chlorine or 5% v/v bleach solution) containing 0.1% Tween 20 surfactant for 20 min, followed by six rinses in

sterilised, distilled water, in a sterile environment. Seed was sown using a sterilised aluminium spatula on agar media (see below), and petri dishes subsequently sealed using laboratory film (Parafilm).

Culture media and culture conditions

The basal culture medium consisted of modified Malmgren's orchid medium (Malmgren 1996,

ORIGINAL ARTICLE

Pea seed extracts stimulate germination of the terrestrial orchid *Ophrys apifera* Huds. during a habitat restoration project

SIMON PIERCE¹, VALENTINA GUIDI², ANDREA FERRARIO^{3,4}, ROBERTA M. CERIANI⁴, MASSIMO LABRA², ILDA VAGGE¹, & BRUNO E. L. CERABOLINI³

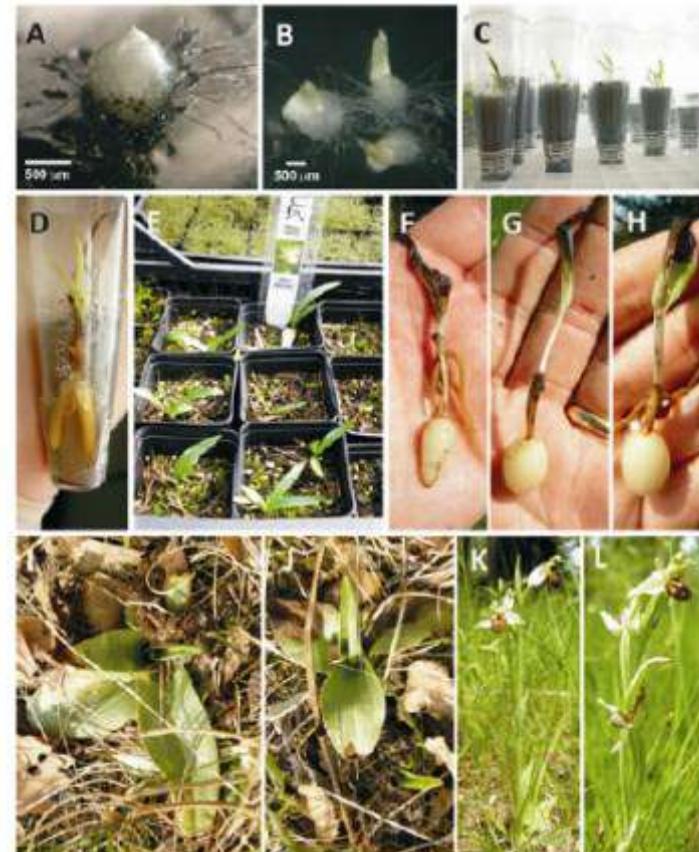
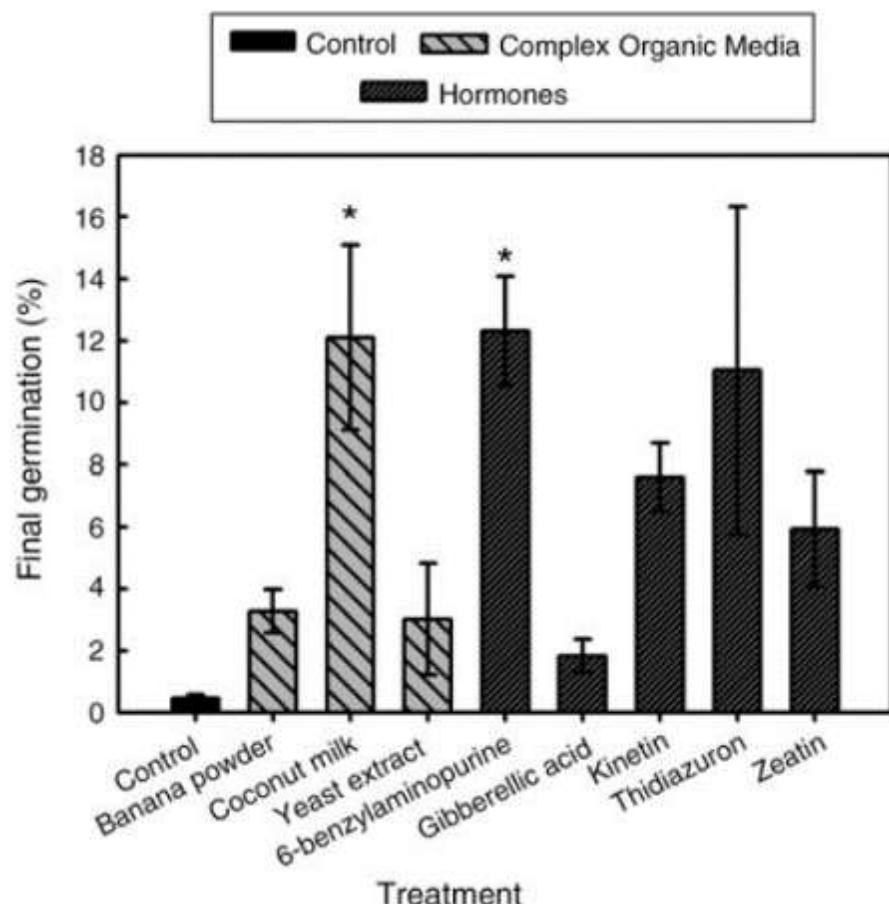


Figure 3. Propagation *in vitro*, cultivation and population reinforcement of *Ophrys apifera*: (A) a seedling (protocorm) 7 months after sowing *in vitro* on Malmgren's medium plus 5% (v/v) coconut milk, (B) plantlets with the first green leaf and rhizoids growing in the dark at 8 months after sowing, ready for transplantation to De Wit tubes, (C) plantlets at 11 months after sowing, growing in De Wit tubes on Malmgren's medium plus 10% (v/v) coconut milk in the light, (D) tuber production *in vitro* 26 months after sowing, (E) 3-year old plants in cultivation in a temperate greenhouse, (F–H) three of the 391 tubers used during population reinforcement at Parco Monte Barro, Lecco, Italy, in 2011, shown at 4-year after sowing, in the summer resting phase when plants can be handled and transplanted, (I, J) rosettes of the tubers shown in G and F, respectively, in the spring of the fifth year (i.e. 8 months after transplantation to the wild), and (K, L) some of the 17 plants in flower and in fruit later in the fifth year (both photos taken on 1/6/2012). Photos by Simon Pierce.



RESEARCH PAPER

Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination

S. Pierce¹ , A. Spada¹, E. Caporali², R. M. Ceriani³ & G. Buffa⁴

1 Department of Agricultural and Environmental Sciences (DiSAA), University of Milan, Milan, Italy

2 Department of Biosciences, University of Milan, Milano, Italy

3 The Native Flora Centre (Centro Flora Autoctona; CFA), c/o Parco Monte Barro, Galbiate, Italy

4 Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, University Ca' Foscari of Venice, Venice, Italy

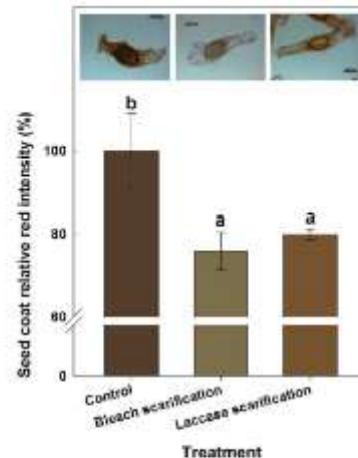


Fig. 2. The intensity of red colouration (following dying with phloroglucinol-HCl) of the testa of *Anacamptis morio* seed pre-treated with distilled water (control), bleach or laccase, expressed as a percentage of the mean control value. Colours represent the actual mean colour (red/green/blue, RGB, value) for each treatment, the value for each replicate seed being calculated as the mean of three values across the carapax region. Different letters denote significant differences between means ($n = 6 \pm 1$ SE at $P \leq 0.01$ (ANOVA, df = 2, $F = 10.333$, $P = 0.002$; followed by Tukey's multiple comparison procedure). Photomicrographs, inset, represent examples of typical seed coat colours following each treatment.





RESEARCH PAPER

Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination

S. Pierce¹ , A. Spada¹, E. Caporali², R. M. Ceriani³ & G. Buffa⁴

1 Department of Agricultural and Environmental Sciences (DiSAA), University of Milan, Milan, Italy

2 Department of Biosciences, University of Milan, Milano, Italy

3 The Native Flora Centre (Centro Flora Autoctona; CFA), c/o Parco Monte Barro, Galbiate, Italy

4 Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, University Ca' Foscari of Venice, Venice, Italy

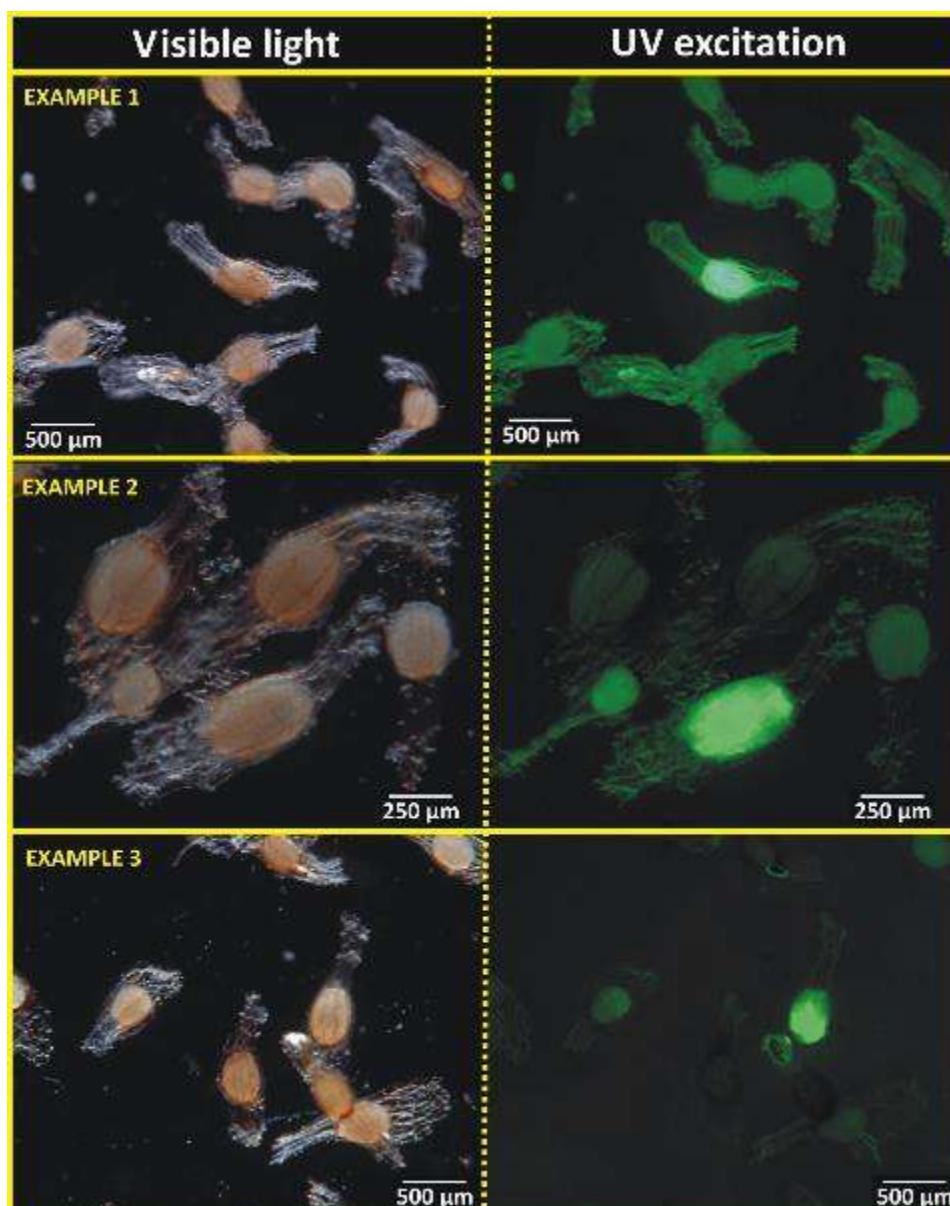


Fig. S1. Examples of seeds of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) exposed to fluorescein and washed in distilled water, seen under visible light (left column) or UV light (right column), respectively, with water uptake evident for individual seeds as fluorescence within the embryo. (Alberto Spada, Simon Pierce).



RESEARCH PAPER

Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination

S. Pierce¹ , A. Spada¹, E. Caporali², R. M. Ceriani³ & G. Buffa⁴

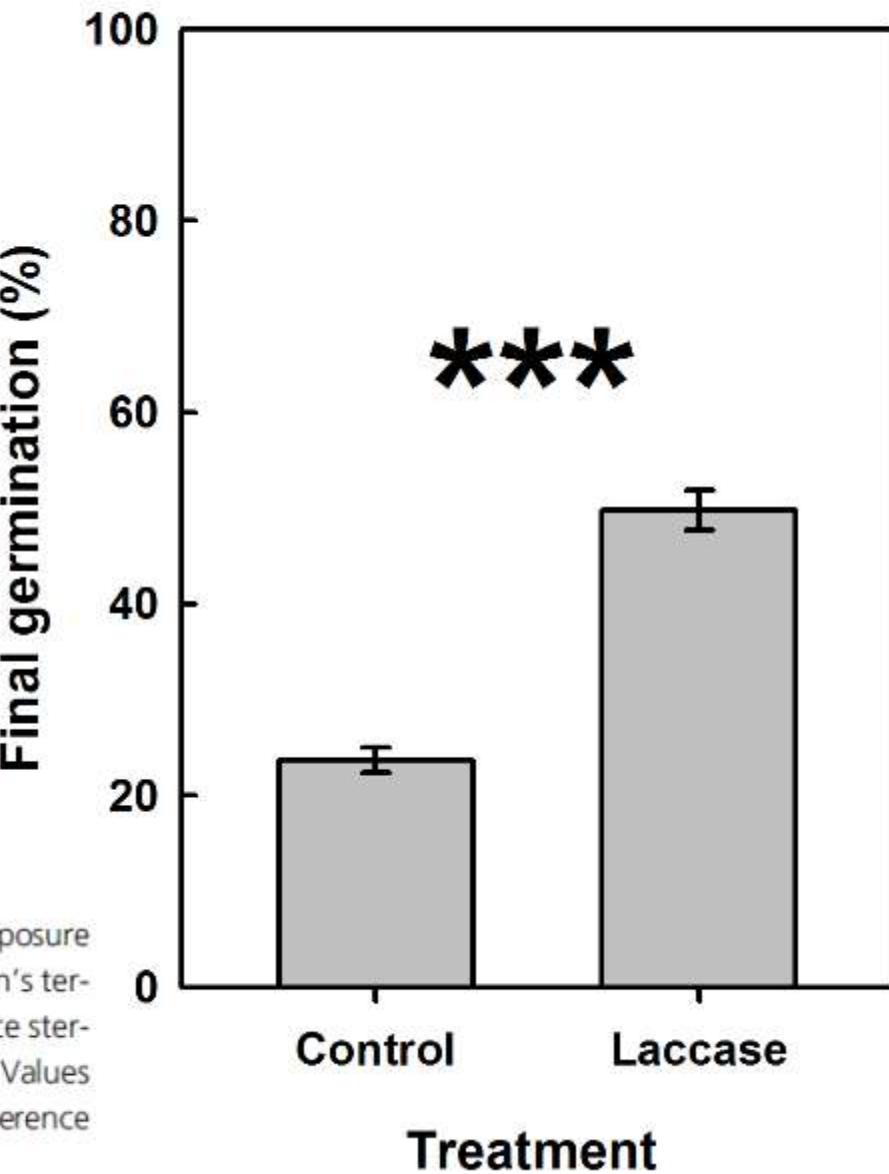
¹ Department of Agricultural and Environmental Sciences (DiSAA), University of Milan, Milan, Italy

² Department of Biosciences, University of Milan, Milano, Italy

³ The Native Flora Centre (Centro Flora Autoctona; CFA), c/o Parco Monte Barro, Galbiate, Italy

⁴ Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics, University Ca' Foscari of Venice, Venice, Italy

Fig. 1. Final germination of *Anacamptis morio* after 6 months of exposure to 1 U laccase, incorporated directly into the agar substrate (Malmgren's terrestrial orchid medium) *in vitro*, compared to a standard bleach surface sterilisation/scarification treatment (10% bleach for 10 min; control). Values represent means \pm 1 SE. Asterisks, ***denote a significant difference between means at $P \leq 0.001$ (Student's *t*-test; $n = 25$).



Himantoglossum adriaticum

mature seed in nylon mesh seed packages; after
Batty et al. (2001) *New Phytologist* 153(3): 511-520

Pore size 90 µm



Cypripedium calceolus

mature seed in nylon mesh seed packages; after
Batty et al. (2001) *New Phytologist* 153(3): 511-520



Spiranthes aestivalis



Spiranthes aestivalis



Spiranthes aestivalis



Critical phase 3: Cultivation *in vitro*

De Wit tube

The plantlets are ready to be transferred to larger containers when one small green leaf is visible



Serapias vomeracea



Ophrys benacensis

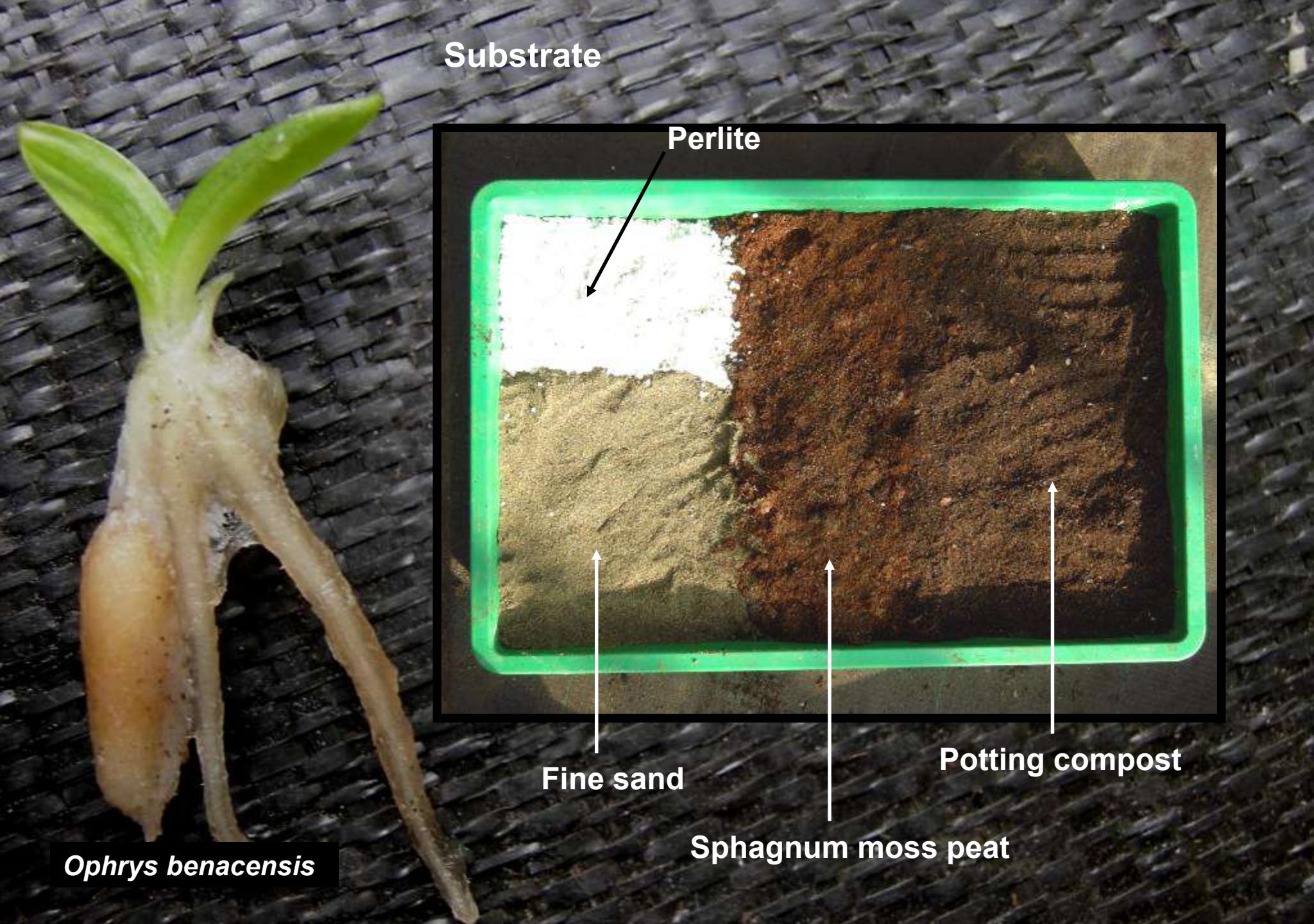


Critical phase 4: Cultivation in soil



Ophrys benacensis





Mix it up!



Ophrys benacensis





Keep the humidity high in the first week by covering the plants with the tops of De Wit tubes, but do not leave these in the sun



Ophrys sphegodes



Ophrys sphegodes



Ophrys apifera



Ophrys sphegodes



Ophrys benacensis





Serapias vomeracea



Dactylorhiza traunsteineri



Most species need good drainage and dry soil, but wetland species do NOT

For these species, do not add sand to the growth medium,
stand in water but be careful as rotting can occur



Goodyera repens



Woodland species can be grown on coconut fibre, leaf litter and moss



Critical phase 5: Transplantation to nature





The leaves have died back, but the tubers look beautiful
– this is the right moment for transplantation









All plants produced *in vitro*, at 3 years after transplantation





All plants produced *in vitro*, at 3 years after transplantation



Serapias vomeracea



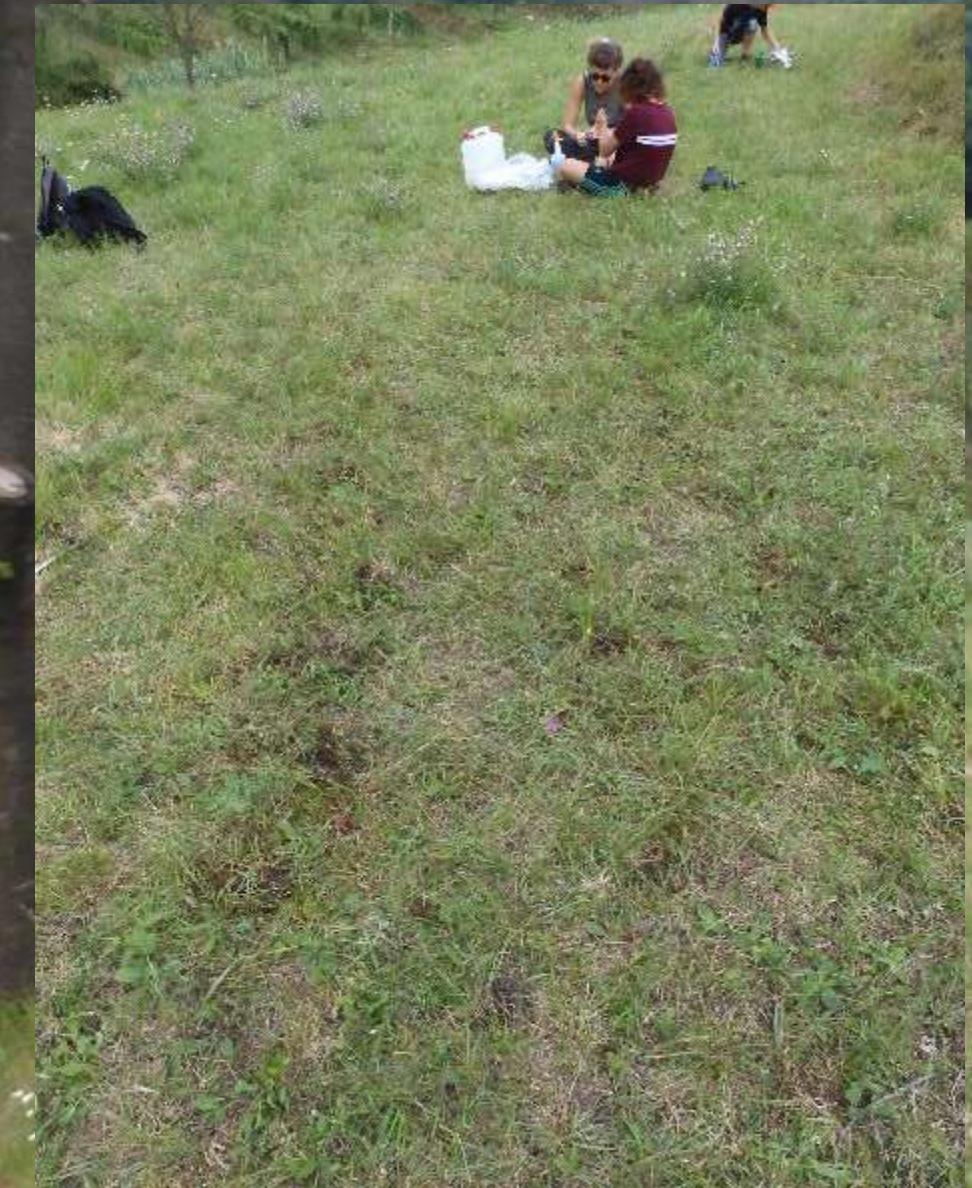
Parco Regionale di Monteverchia e della Valle del Curone, 30/July/2021

Reintroduction of 350 plants of *Ophrys benacensis* and 40 *Serapias vomeracea*,
using seeds collected from Bergamo province and Lecco in 2018, propagated *in vitro*



Parco Regionale di Monteverchia e della Valle del Curone, 30/July/2021

Reintroduction of 350 plants of *Ophrys benacensis* and 40 *Serapias vomeracea*, using seeds collected from Bergamo province and Lecco in 2018, propagated *in vitro*





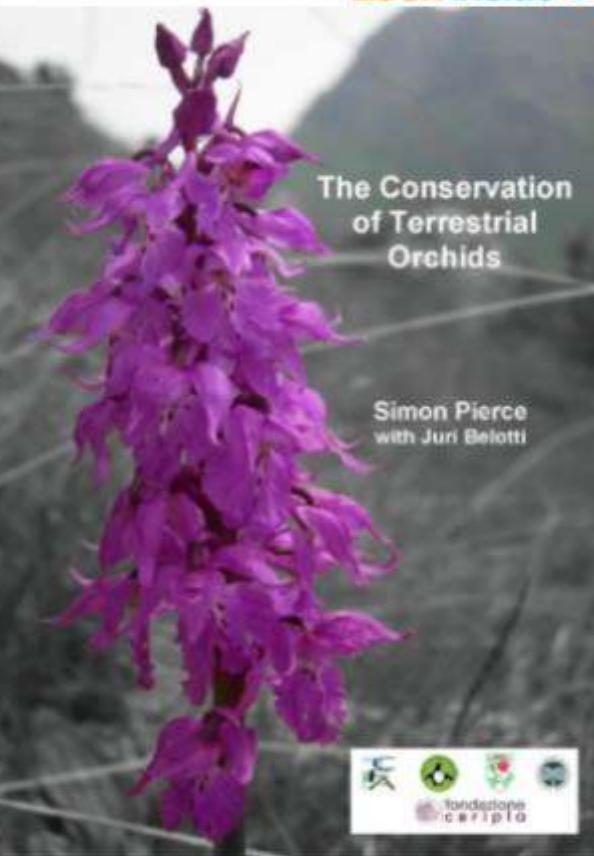
Conclusions

- Population reinforcement using plants produced from seed is a time consuming process that involves more failure than it does success (BUT it does work!)
- Long-term monitoring is rarely part of financed projects, but our observations suggest that reintroduced plants do survive and do effectively increase population sizes





[Look inside](#) ↓



Conservation of Terrestrial Orchids Kindle Edition

by Simon Pierce (Author) | Format: Kindle Edition

[See all formats and editions](#)

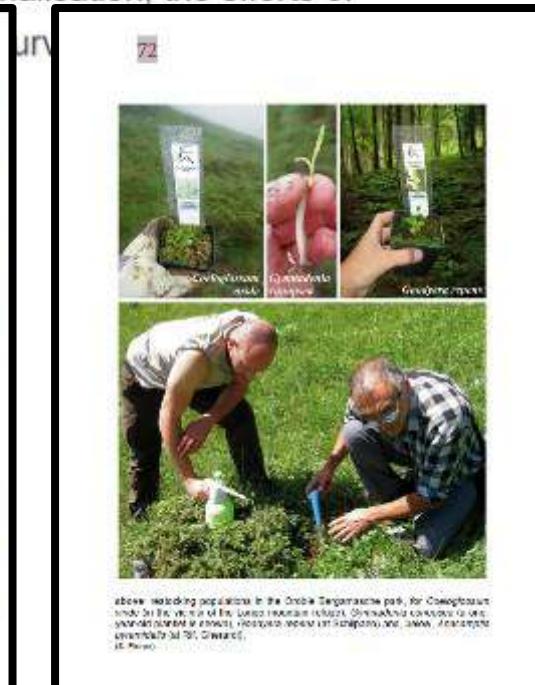
Kindle

\$9.62

[Read with Our Free App](#)

Orchids include some of the rarest and most beautiful plants in nature, but their existence in Europe is intimately intertwined with agriculture and traditional ways of life throughout the richly diverse geographic landscape of the continent. This book charts the spread of orchids alongside traditional agricultural methods and, following the tumultuous changes in human society since industrialisation, the efforts of parks and i

[Read more](#)



above: rearing populations in the Orobio Tangamanshe park for *Carex ligulata* orchids for the return of the *Carex ligulata* orchid. (Photo: Andrea Gori and Gianfranco Sartori, University of Trieste, Italy)