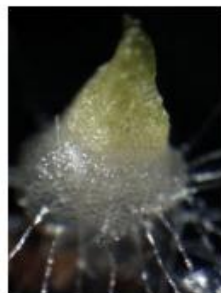
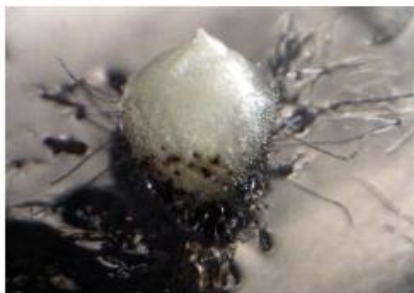


In vitro propagation, cultivation and reintroduction of the genus *Ophrys* (Orchidaceae) during one of the largest orchid restocking projects in the world



Regione
Lombardia



Fondazione Minoprio



Simon Pierce PhD

simon.pierce@unimi.it

Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Milan
Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia

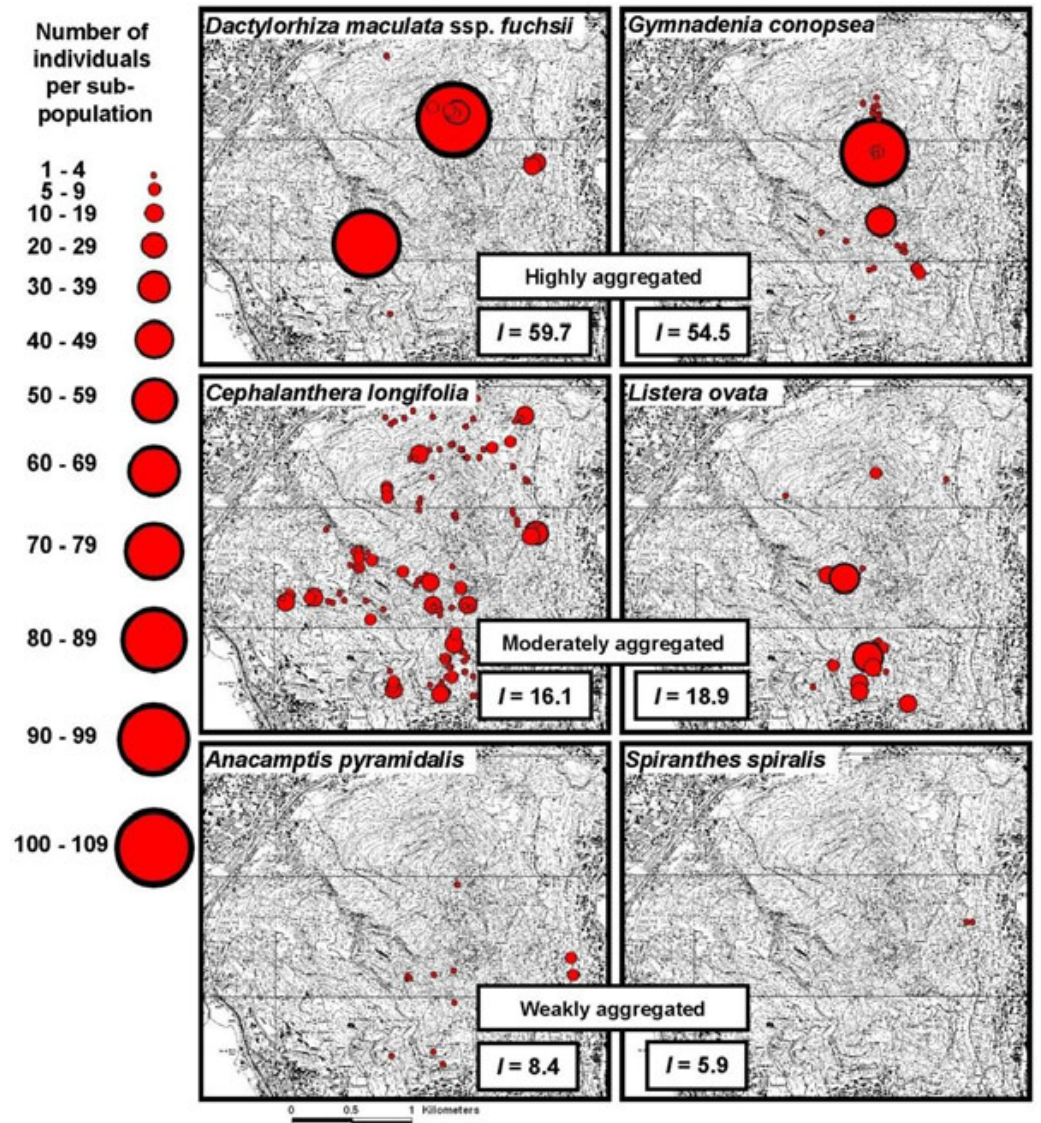


When is *ex situ* conservation appropriate?

1). Locally abundant populations respond well to *in situ* conservation

2). Scattered populations may not require conservation

3). Highly scattered populations are rare even in appropriate habitat, are most likely to benefit from *ex situ* conservation, and are most likely to be inbred



***In situ* conservation is always best, but for some species additional *ex-situ* methods are necessary ...**



Project ORCHIS

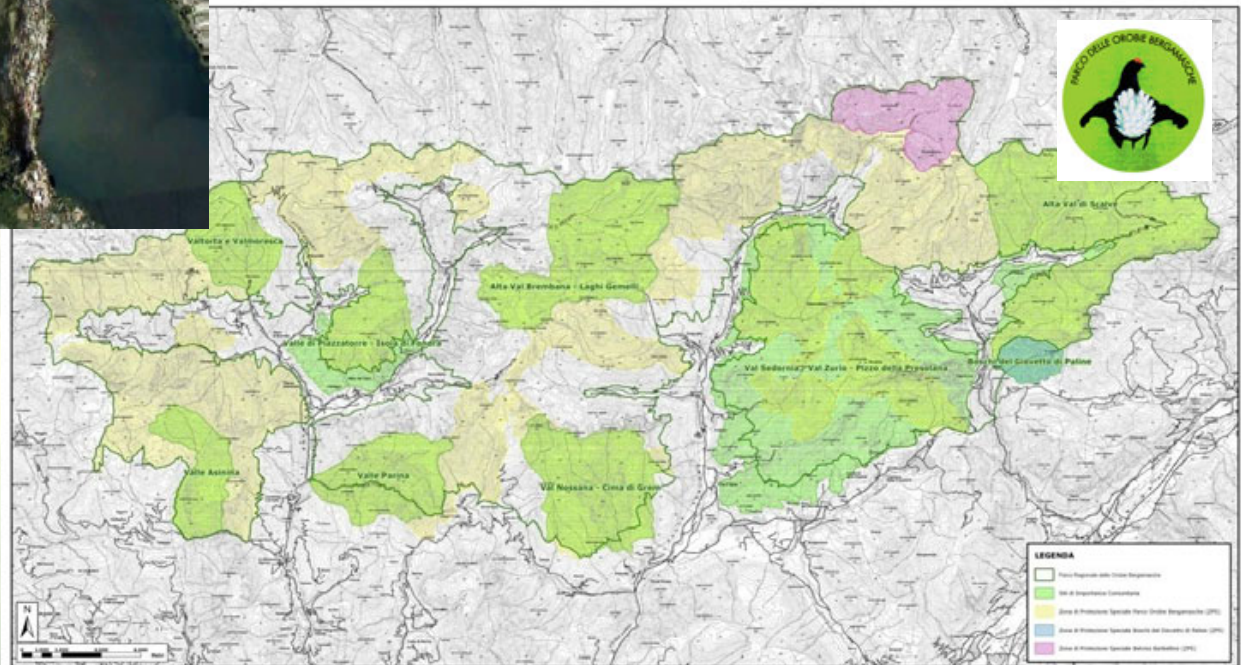
Orchid Restocking and Conservation for Higher altitude Indigenous Species

April 2009 – September 2011

Parco del Monte Barro



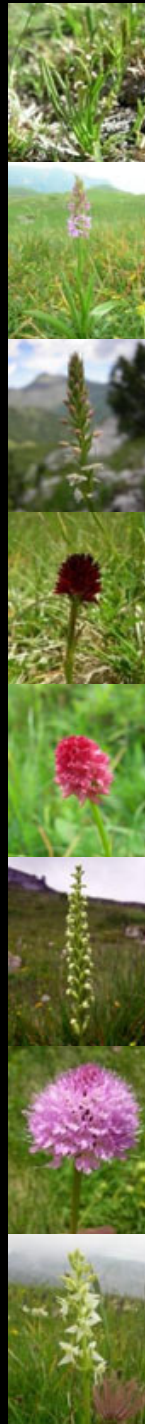
Parco delle Orobie Bergamasche



List of the 20 target species of project ORCHIS (in red, the rarest species).
Rarity index from Ferlinghetti (2001).

Species	Rarity index
<i>Chamorchis alpina</i>	99.0
<i>Cephalanthera rubra</i>	89.5
<i>Cypripedium calceolus</i>	94.3
<i>Dactylorhiza traunsteineri</i>	97.1
<i>Goodyera repens</i>	94.3
<i>Herminium monorchis</i>	96.2
<i>Nigritella rubra</i>	93.3
<i>Ophrys apifera</i>	87.6
<i>Ophrys benacensis</i>	90.5
<i>Orchis papilionacea</i>	99.0
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	65.7
<i>Coeloglossum viride</i>	58.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	32.4
<i>Gymnadenia odoratissima</i>	52.4
<i>Nigritella rhellicani</i>	62.9
<i>Ophrys sphegodes</i>	82.9
<i>Orchis morio</i>	79.0
<i>Orchis provincialis</i>	79.0
<i>Pseudorchis alpina</i>	63.8
<i>Traunsteinera globosa</i>	51.4

Pasture grasslands, high altitude



Woodland, high altitude



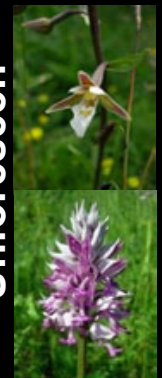
Wetland



Meadows, low/intermediate altitude



Unforeseen



Seeds of 23 species were collected from 18 sites (6 SCI, 4 ASP)



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

10,145 plants were returned to the wild

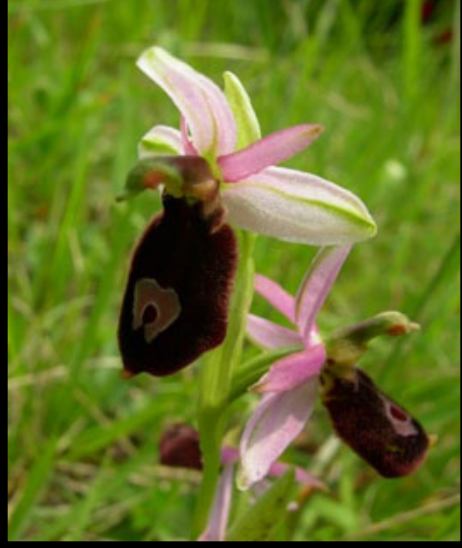


Anacamptis morio, *A. pyramidalis*, *Coeloglossum viride*, *Dactylorhiza traunsteineri*, *Goodyera repens*, *Gymnadenia conopsea*, *G. odoratissima*, *Nigritella nigra* ssp. *rhellicani*, *Orchis provincialis*, *Ophrys apifera*, *O. benacensis*, *O. sphegodes*, *Pseudorchis albida*, *Serapias vomeracea*

Ophrys apifera



Ophrys benacensis



Ophrys sphegodes



EU Habitat 6210*





Ophrys sphegodes



Ophrys sphegodes

Seed sowing



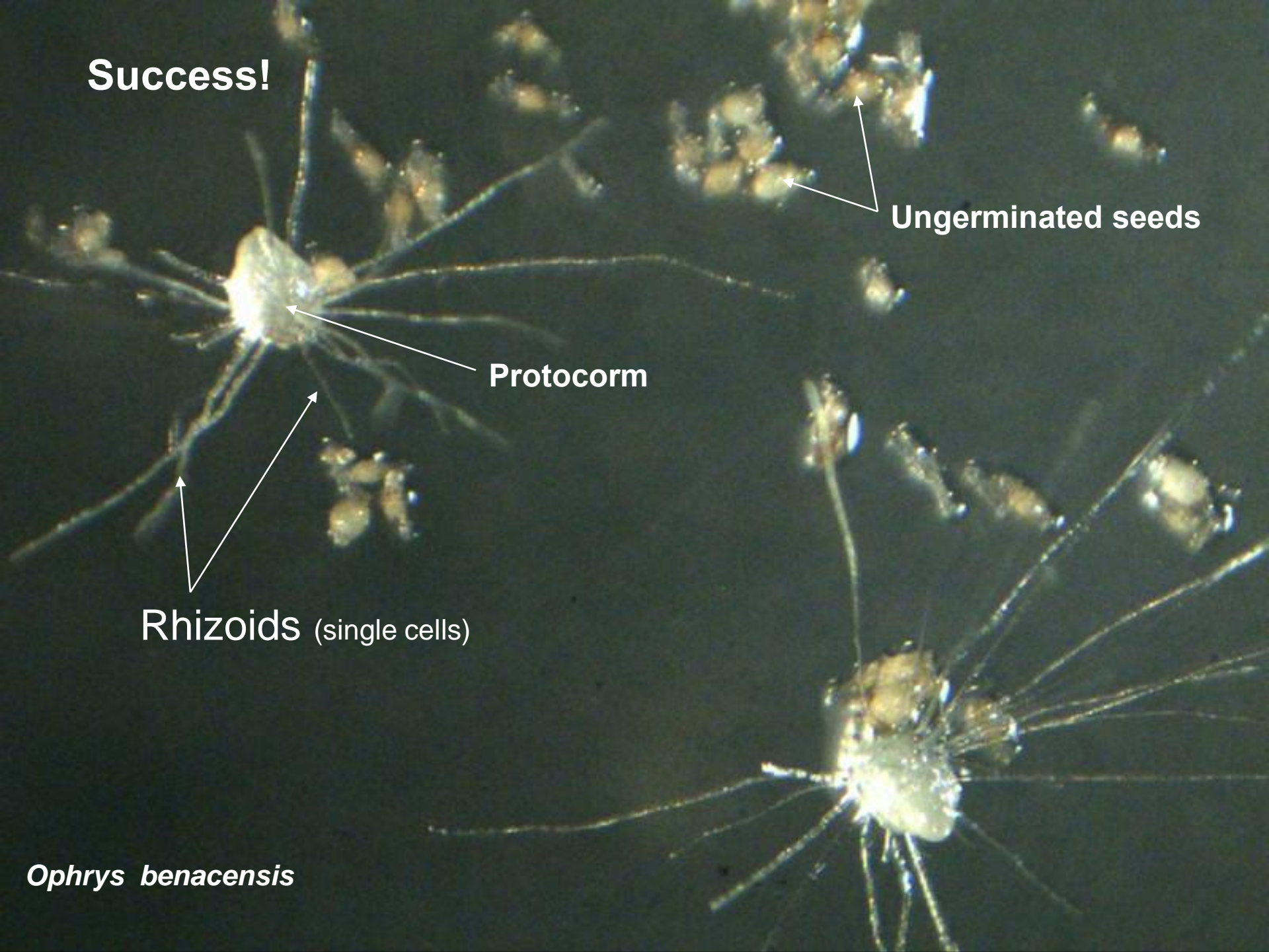
Success!

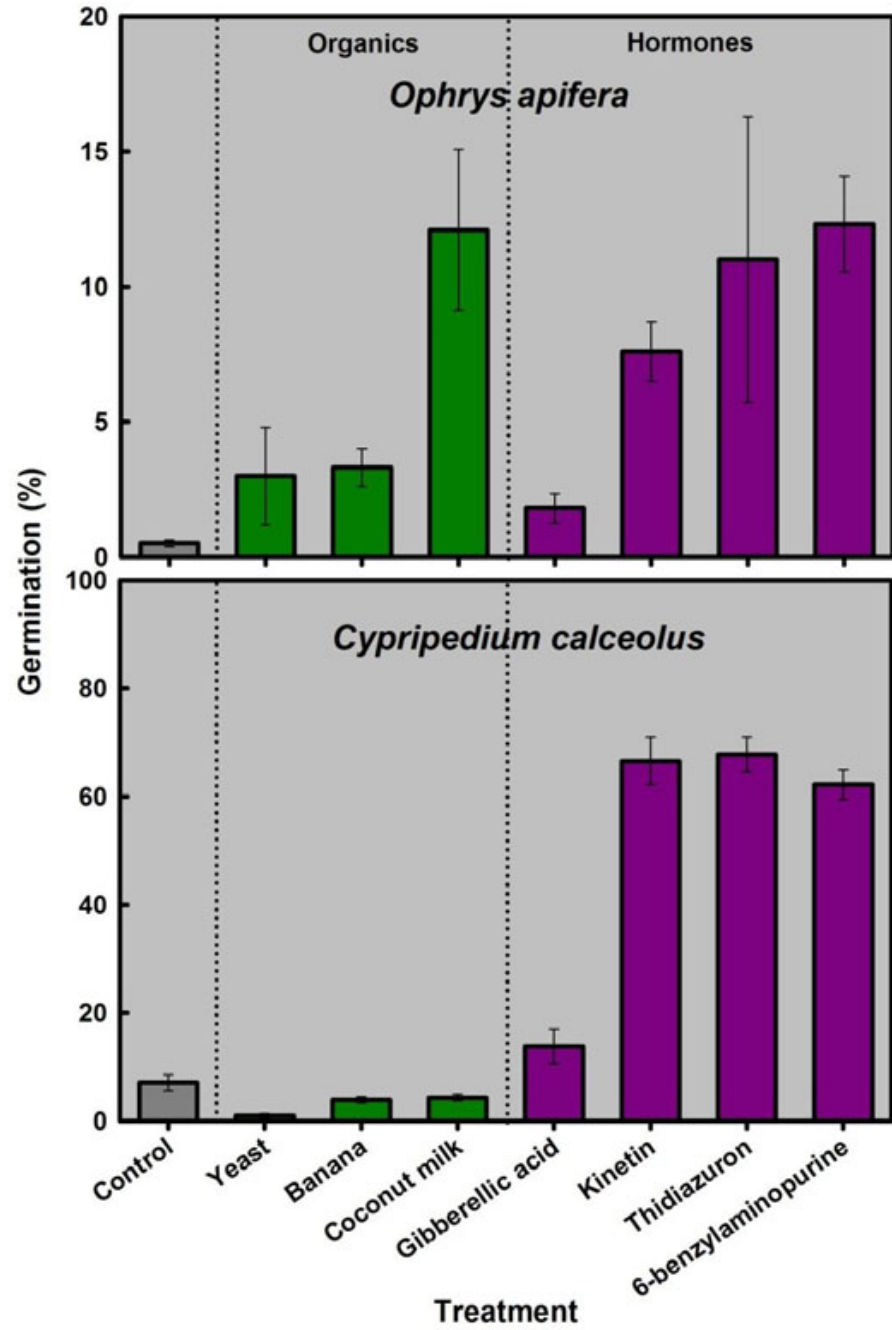
Ungerminated seeds

Protocorm

Rhizoids (single cells)

Ophrys benacensis

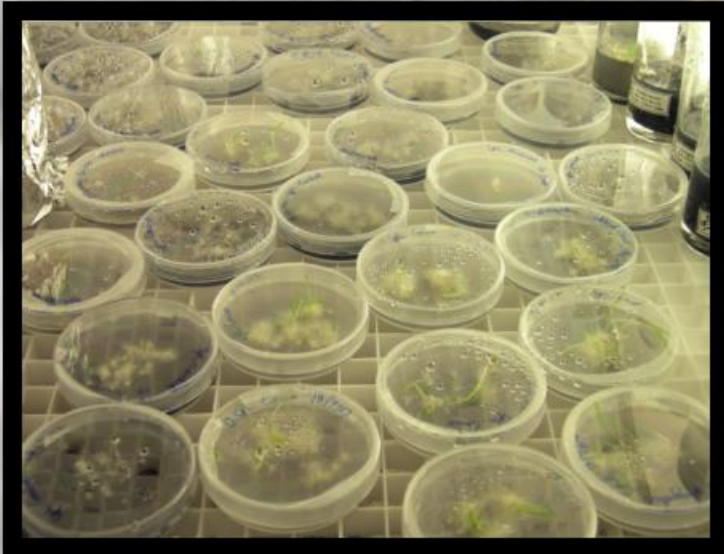






Ophrys apifera

Ophrys benacensis





Orchis morio







Ophrys benacensis



Serapias vomeracea



Ophrys sphegodes







Ophrys apifera



2009



2010





*Ophrys
sphegodes*



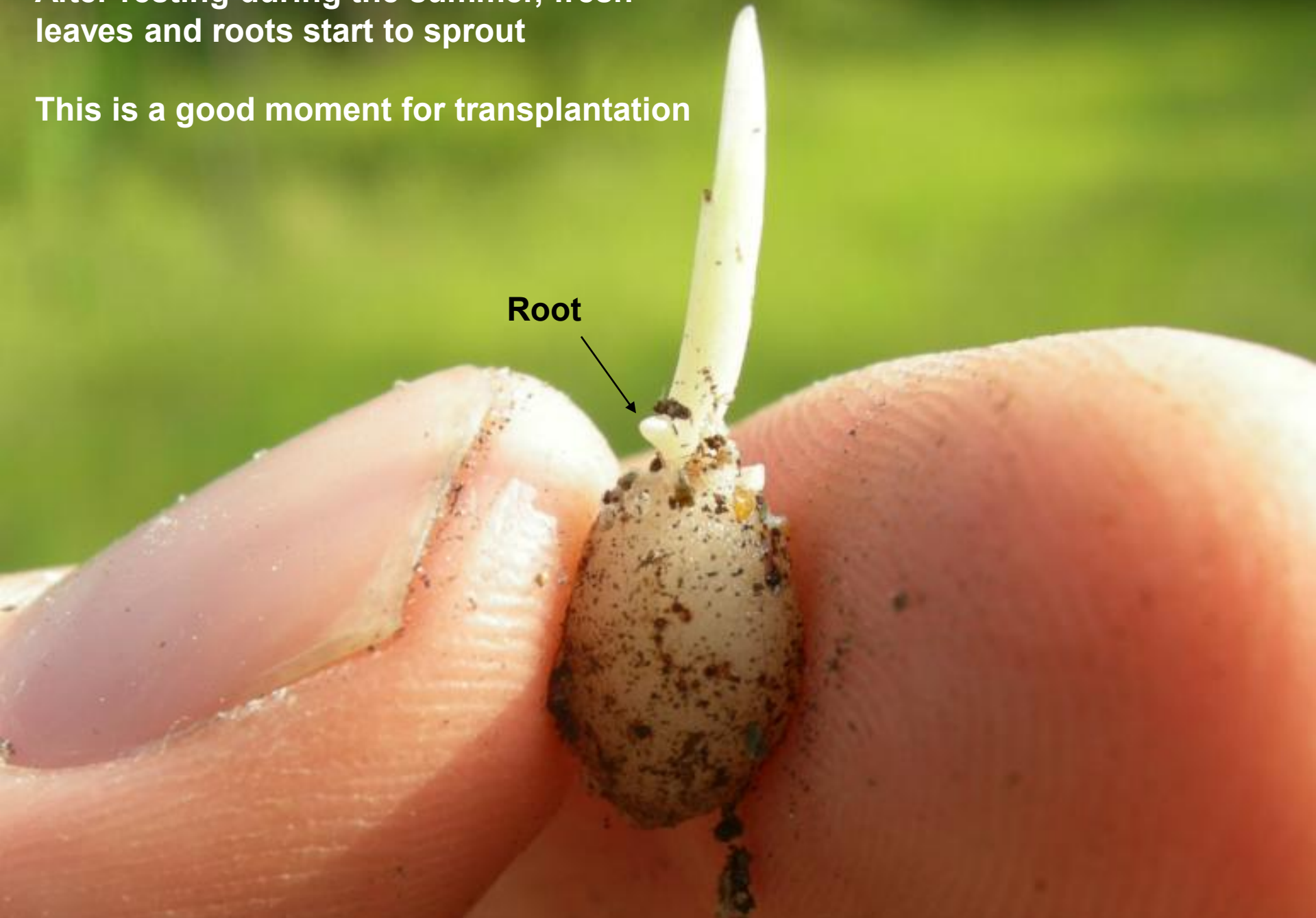
The leaves have died back, but the tubers look beautiful – this is the right moment for transplantation



Ophrys apifera

After resting during the summer, fresh
leaves and roots start to sprout

This is a good moment for transplantation





Pierfranco Arrigoni



17/08/2010



Pierfranco Arrigoni



Photo: Pierfranco Arrigoni



Photo: Pierfranco Arrigoni





Photo: Oliver Pierce





Photo: Pierfranco Arrigoni

Ophrys benacensis

13/10/2010





5/4/2011

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

SIMON PIERCE^{1*}, VALENTINA GUIDI², ANDREA FERRARIO^{3,4}, ROBERTA M. CERIANI⁴,
MASSIMO LABRA², ILDA VAGGE¹, BRUNO E. L. CERABOLINI³

(in press)



Conservation through public awareness



CHIOSTRO DI VOLTORRE
Varese Orchidea'10
 10-11-12 Settembre 2010

Esposizione internazionale di Orchidologia
 Conferenze a tema, seminari, corsi

Venerdì 9 Settembre 11:00 - 19:30 Venerdì 10 Settembre 11:00 - 19:30 Sabato 11 Settembre 11:00 - 19:30 Domenica 12 Settembre 11:00 - 19:30

Chiostro di Voltorre - Piazza Chiostro, 23 - Gavirate - VA
 INGRESSO LIBERO

Da Venerdì 6 a Domenica 8 Novembre 2009
 la città di Varese diventerà sede
 di un evento floreale d'eccezione:

Varese Orchidea '09

È l'evento nato dalla collaborazione della Provincia di Varese con l'Alao, Associazione Lombarda Amatori Orchidee, che saprà trasformare la restaurata Chiostro in un'esotica atmosfera che solo il fascino di un fiore d'eccezione come l'orchidea sa creare e diffondere.

PROGRAMMA MANIFESTAZIONE

Espongono alla manifestazione collezionisti europei, hobbisti ed esperti coltivatori di fama internazionale.
 Ricordiamo: AM Orchidee - France, Riboni Orchidee - Italia, Ryanne Orchidee - Francia, Amazone - Belgio, Orchideria di Morosolo - Italia

Venerdì 6 Inaugurazione
 ore 16,00 apertura mostra
Venerdì 6 ore 15,30 giudizio e assegnazione premi
 ore 18,30 chiusura mostra

Sabato 7 ore 10,00 apertura mostra
 ore 10,30 Mostra la collezione della famiglia
 ore 11,30 Prof. Simon Pierce - La conservazione delle Orchidee spontanee della Regione Lombardia
 ore 12,00 mostra la collezione della famiglia delle Cypripedium
 ore 14,00 Prof. Alberto Furlan Farina e colori delle Orchidee
 ore 18,30 chiusura mostra

Domenica 8 ore 10,00 apertura mostra
 ore 10,30 Alao - La collezione della Provincia di Varese
 ore 11,30 Paolo Lugli - Orchidee (di non solo) in Brezza
 Aperti laboratori di un viaggio nelle regioni tropicali
 ore 15,30 A. Valenza - La collezione delle orchidee con l'aiuto della luce artificiale, e gli anni da non fare
 ore 18,30 chiusura mostra

Da Venerdì 9 a Domenica 11 Settembre 2011 il Chiostro di Voltorre diventerà sede di un evento floreale d'eccezione:

VOLTORRE ORCHIDEA'11

È l'evento nato dalla collaborazione e con il finanziamento della Provincia di Varese e la Camera di Commercio con l'Alao, Associazione Lombarda Amatori Orchidee, che saprà trasformare il restaurato Chiostro in un'esotica atmosfera che solo il fascino di un fiore d'eccezione come l'orchidea sa creare e diffondere.

Espongono alla manifestazione collezionisti europei, hobbisti ed esperti coltivatori di fama internazionale.
 Ricordiamo: AM Orchidee - France, Riboni Orchidee - Italia, Ryanne Orchidee - Francia, Amazone - Belgio, Orchideria di Morosolo - Italia

PROGRAMMA MANIFESTAZIONE

Venerdì 9 Settembre
 ore 9,30 apertura mostra
 ore 17,30 inaugurazione
 ore 19,00 chiusura mostra

Sabato 10 Settembre
 ore 9,30 apertura mostra
 ore 10,30 giudizio e assegnazione premi
 a cura dell'Associazione Italiana di Orchidologia
Conferenza

ore 11,30 Prof. Simon Pierce, Università dell'Insubria, Varese:
 "Il progetto ORCHIS: Conservazione e ripopolamento di orchidee autoctone prealpine"

ore 16:00 Prof. Achille Ghidoni, Università dell'Insubria, Varese:
 "La biodiversità delle orchidee"
 ore 19,00 chiusura mostra

Domenica 11 Settembre
 ore 9,30 apertura mostra
 ore 10,30 Alao: "La coltivazione delle orchidee da clima caldo"
Conferenza
 ore 11,30 Prof. Walter Rossi Università degli Studi dell'Aquila:
 "La variabilità delle orchidee a cavallo dell'Equatore"
Conferenza
 ore 15,30 Alessandro Valenza: "Le orchidee del Sud-Est asiatico"
 ore 19,00 chiusura mostra

Una ricerca per la conservazione delle Orchidee spontanee

Per la prima volta al mondo, individuato e testato un numero consistente di metodi per favorire la conservazione delle Orchidee autoctone



Cypripedium calceolus

Sabato 7 Novembre 2009, il dottor Simon Pierce, ricercatore a tempo determinato della Facoltà di Scienze MM.FENN di Varese, ha presentato i primi risultati del progetto ORCHIS, nell'ambito di "Varese Orchidea '09", mostra organizzata presso Villa Recalcati dalla ALAO (Associazione Lombarda Amatori Orchidee).

Questo progetto, finanziato dalla Fondazione CARIPLO, ha consentito di istituire la posizione di ricercatore a tempo determinato e viene condotto dall'Università degli Studi dell'Insubria, in collaborazione con il Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia e il Parco delle Orobie Bergamasche; l'obiettivo è la conservazione delle Orchidee spontanee della Lombardia, in particolare

di quelle pre-alpine e alpine.

La conservazione di queste rare piante dipende innanzitutto dalla salvaguardia degli *habitat* idonei e dalla protezione delle popolazioni selvatiche, tuttavia, quando alcune popolazioni diventano troppo piccole, magari per via di raccolte indiscriminate, le piante che rimangono costituiscono gruppi di individui strettamente imparentati. A questo punto la riproduzione viene limitata non solo da ciò che il dottor Pierce descrive come "relazioni incestuose",

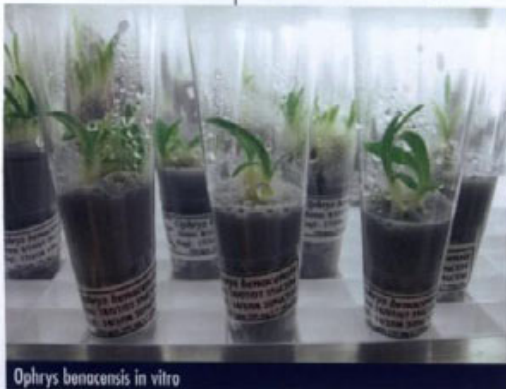
ma anche dal fatto che poche piante fiorite possono incontrare difficoltà nell'attrarre gli impollinatori. Di conseguenza la produzione di semi vitali diventa sempre più difficoltosa, con gravi minacce per il mantenimento delle popolazioni. Alcuni benefici possono derivare da azioni di conservazione per evitare l'effetto "collo di bottiglia" che porta a popolazioni "deprese".

Per questi motivi il nucleo del progetto ORCHIS è rappresentato da attività tese ad individuare specie e popolazioni per le quali interventi *ex situ* possono essere particolarmente importanti. Per queste popolazioni vengono ricercati e sviluppati metodi per migliorare la ricchezza genetica delle popolazioni, la germinazione dei semi, la coltivazione *in vitro* e infine il trapianto in natura, processi particolarmente problematici, poiché le Orchidee presentano cicli vitali estremamente lunghi e complessi.

Il progetto intende, quindi, individuare i metodi migliori per favorire i diversi stadi del ciclo vitale delle Orchidee autoctone. Sebbene tali processi possano richiedere molto tempo (a volte devono passare diversi anni dalla germinazione, perché una pianta sia pronta per il trapianto in natura), il progetto ORCHIS si avvale delle conoscenze scientifiche precedentemente acquisite dal gruppo di ricerca del professor Bruno Cerabolini ed ha già ottenuto notevoli successi nella germinazione e nella coltivazione di numerose specie "difficili", come la steno-endemica *Ophrys benacensis*.

In ogni caso, uno dei primi risultati attesi del progetto è l'individuazione di vari fito-ormoni che possano incrementare notevolmente il tasso di germinazione e quindi il numero di piante prodotte, ad esempio da utilizzare per *Cypripedium calceolus* o Scarpetta di Venere, un'altra di queste orchidee difficili, con fiori estremamente vistosi e ormai rarissima.

Per un'altra specie, l'Orchidea Bianca (*Leucorhynchus albida*), tutti i tentativi di germinazione e di coltivazione fin ora condotti sono stati vani, tuttavia il dottor Pierce ha spiegato come quest'anno, grazie al progetto ORCHIS, per la prima volta al mondo un numero consistente di metodi sia stato individuato e testato sistematicamente.



Ophrys benacensis in vitro



CENTRO FLORA AUTOCTONA

La conservazione delle orchidee spontanee lombarde

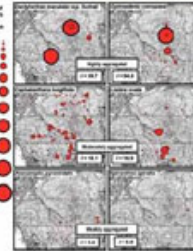


Un impegno per la salvaguardia della biodiversità



Quando la conservazione dei prati non è sufficiente

L'analisi della distribuzione e delle dinamiche delle popolazioni indica quali specie possono trarre benefici dalla conservazione degli habitat o della riproduzione ex situ.



A volte le popolazioni di orchidee possono diventare così piccole da rendere insufficiente la tutela degli habitat quale strumento di gestione, conservazione e recupero. Le piccole popolazioni attraggono un minor numero di impollinatori: anche quando gli insetti pronubi riescono a raggiungere gruppi più isolati di piante, tendono ad effettuare brevi voli tra fiori vicini impollinando solo individui imparentati, piuttosto che effettuare ampi voli lenti e casuali come in presenza di maggiore ricchezza floristica. In questo modo il polline va a fecondare fiori con stretto legame di parentela (geneticamente molto simili), e come nei mammiferi tra consanguinei, ciò può portare a problemi di infertilità e sviluppo. Che cosa si può fare in questi casi? La ricerca condotta presso il Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia (CFA) dimostra che le popolazioni di orchidee rientrano in tre categorie, con diversi livelli di rischio:

- specie presenti in più habitat che non hanno bisogno di conservazione;
- specie comuni a livello locale in un dato habitat, che rispondono bene alla conservazione dell'habitat stesso;
- specie caratterizzate da popolazioni di piccole dimensioni, anche nel loro habitat ideale.

Floris S., Cattani R.M., Villa M. & Conabelli B. 2016. Quantifying relative extinction risks and targeting intervention for the orchid flora of a natural park in the European pre-Alps. *Conservation Biology* 20(5): 1854-1870.



Sono queste ultime specie - tra cui ad esempio il fior d'ape (*Ophrys apifera*) e il viticcio (*Spiranthes spiralis*) - che beneficiano di un'auto-riproduzione mediante riproduzione ex situ e successivo ripopolamento. Quando le popolazioni "a rischio" sono state identificate, si può raccogliere il polline per la produzione dei semi da una popolazione più grande e sana della stessa specie. Nella foto possiamo vedere il camponamento del polline da un fiore della rarissima endemica orchidea transalpina (*Ophrys beroniensis*), utilizzando uno stuzzicadenti che imita la testa di un insetto.

Floris S., Ferrario A. & Conabelli B. 2015. Outbreeding and asymmetric gene flow in the conservation of the endangered Italian orchid *Ophrys beroniensis*. *Plant Biotechnology* 14(1): 121-127.



Ophrys beroniensis nel Parco Monte Barro (foto di S. Floris e A. Ferrario)

Camponamento del polline di Ophrys beroniensis da una popolazione di riserva (foto di M. Ubbiali)



La Conservazione delle *Orchidee* Terrestri

Simon Pierce
con Juri Belotti



La orchidea *Orchis mascula* in un habitat naturale. Foto: Juri Belotti



Una orchidea in fiore. Foto: Juri Belotti

amplie popolazioni. Le orchidee terrestri, come vedremo nel prossimo capitolo, possono essere particolarmente difficili da produrre da seme e di coltivarle su grande scala, e perfino per le specie che presentano relativamente pochi problemi ciò può comportare un serio impegno economico. Alcune specie hanno resistito a tutti i tentativi fatti per farle germinare.

È generalmente noto che la migrazione assistita non è priva problemi e un intervento per cui le specie vengono introdotte in ambienti dove attualmente non si trovano. Ciò può indurre cambiamenti a livello di vegetazione e non è possibile effettuare in molte zone, tra cui in Lombardia, in quanto le norme non lo consentono. È inoltre difficile prevedere dove avverrà il cambiamento climatico adatto ad una specie; per cui durante questo lasso di tempo le piante si i semi dovranno essere mantenuti ex situ. Ciò nonostante, gli ecologi delle orchidee stanno preparando o ad intraprendere migrazioni assistite e, al riguardo, è preferibile sapere in anticipo i requisiti necessari alla coltivazione di ogni specie.

Previdentemente abbiamo visto che le orchidee richiedono un'etichetta illuminazione, aspetto caratteristico degli habitat aperti quali i pascoli e le radure dei boschi, cospicchi i distacchi antropici tradizionali come la falciatura e la ceccatura hanno fortemente incrementato la distribuzione storica di queste piante. Le orchidee sono intimamente associate alla presenza dell'uomo. Nella sezione seguente, vedremo come in Lombardia questa relazione risulti stretta, soprattutto nelle Alpi.

5. Gli impollinatori dimenticati



Nel 1997, l'esperto di api e di impollinazione Stephen Buchmann e l'ecologista Gary Paul Nabhan hanno pubblicato un libro dal titolo « che abbiamo preso a prestito per intitolare il nostro capitolo - "The Forgotten Pollinators" (Gli impollinatori dimenticati). Questo libro ha fatto pervenire un messaggio inconfondibilmente semplice, ovvero che ci troviamo di fronte a una "crisi di impollinazione" in cui le minacce alla fauna selvatica, in particolare agli insetti selvatici che lavorano per nostro conto al fine di impollinare le colture, minacciano anche la nostra produzione di derrate alimentari. Lo scopo del libro era quello di "riciclare" i legami tra i terreni agricoli e le terre selvatiche circostanti".

Anche se questo messaggio è ormai ampiamente riconosciuto, ce n'era un altro, forse meno noto, nella storia raccontata da Buchmann e Nabhan: a volte le minacce alla conservazione delle specie vegetali non sono sufficienti a conservare i loro impollinatori, con conseguenze disastrose. Hanno citato quello che è ormai diventato un classico esempio nella conservazione delle piante, che sintetizziamo brevemente anche se l'esempio adottato non riguarda le orchidee, ed evidenzia come la storia degli "impollinatori dimenticati" risulti fondamentale sia per la conservazione delle orchidee che per quella delle piante in generale: *Prunella sieboldii* è endemica nel Giappone ed è minacciata dai cambiamenti dell'uso del suolo, in quanto il suo habitat delle rive di fiumi alluvionali viene uti-



Tuberi in fase di trapianto durante un ripopolamento a Monte Bello.



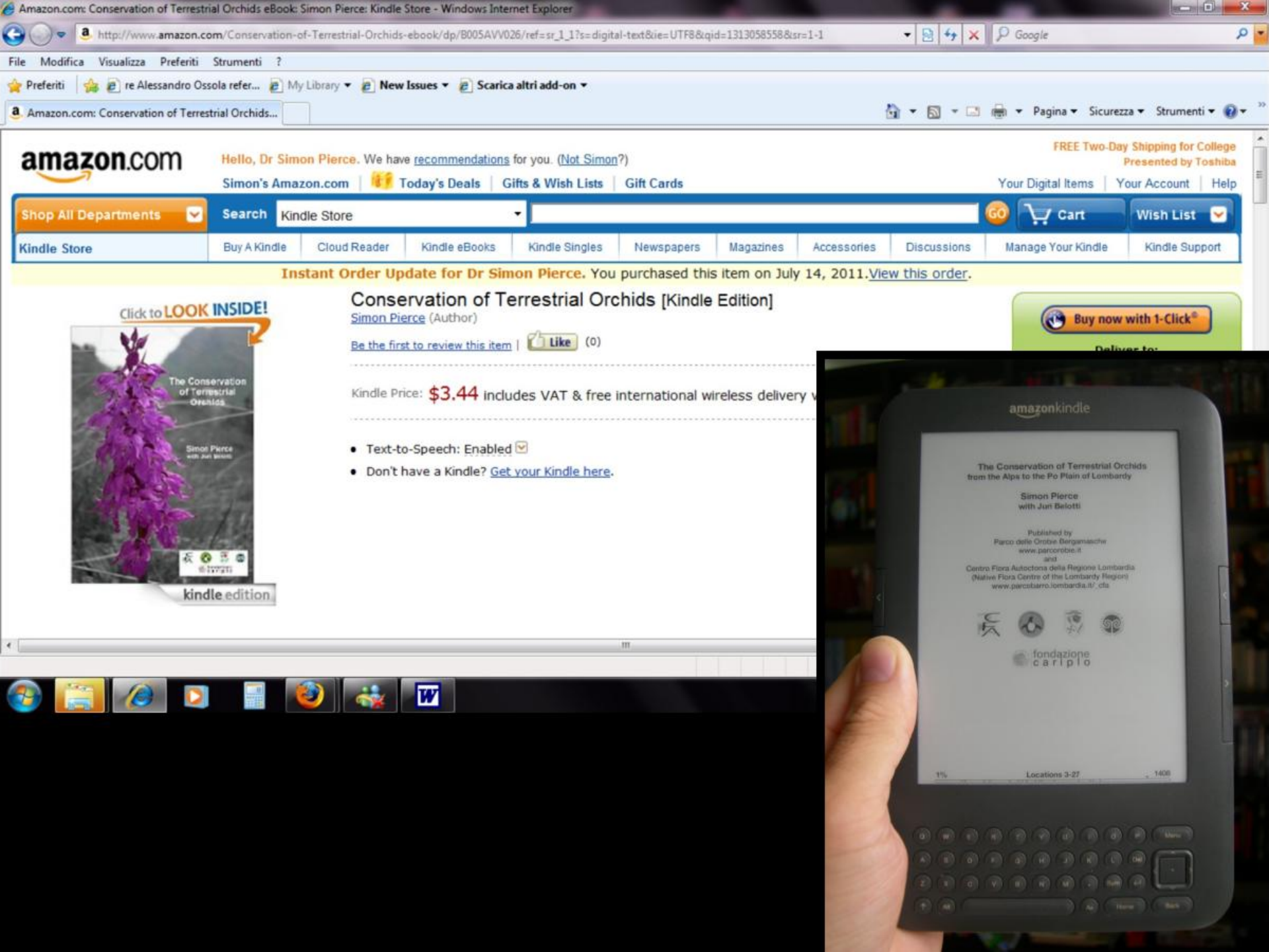
Tuberi di *Serapias virens* due anni dopo la semina in vitro.



Cephaelis epifora quattro anni dopo la semina.



Geneti epifora



amazon.com

Hello, Dr Simon Pierce. We have [recommendations](#) for you. ([Not Simon?](#))

FREE Two-Day Shipping for College
Presented by Toshiba

Simon's Amazon.com Today's Deals | Gifts & Wish Lists | Gift Cards

Your Digital Items | Your Account | Help

Shop All Departments ▾

Search

Cart Wish List

Kindle Store Buy A Kindle Cloud Reader Kindle eBooks Kindle Singles Newspapers Magazines Accessories Discussions Manage Your Kindle Kindle Support

Instant Order Update for Dr Simon Pierce. You purchased this item on July 14, 2011. [View this order.](#)



Conservation of Terrestrial Orchids [Kindle Edition]

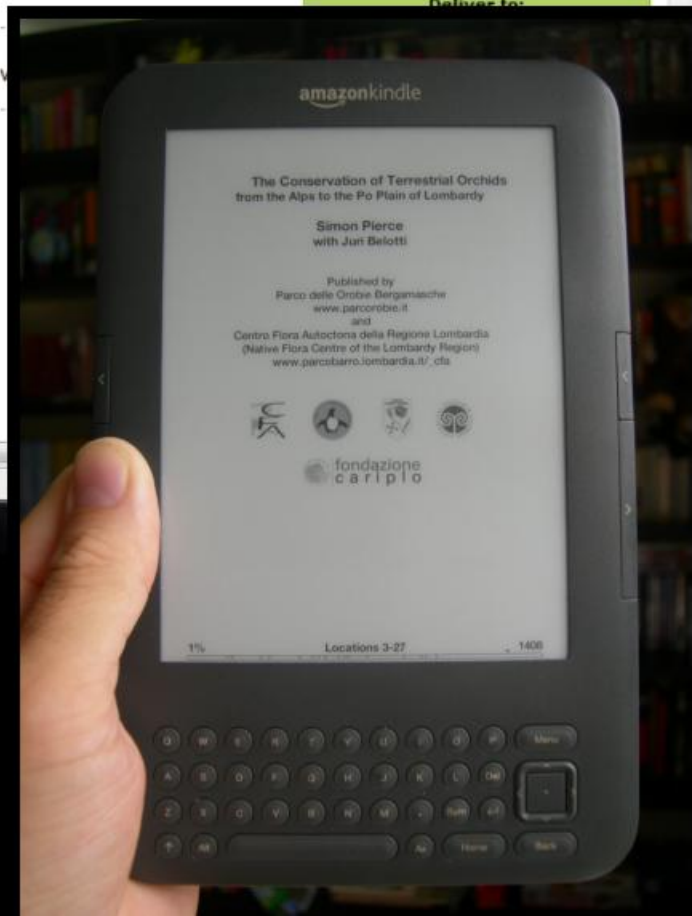
[Simon Pierce](#) (Author)

[Be the first to review this item](#) | Like (0)

Kindle Price: **\$3.44** includes VAT & free international wireless delivery

- Text-to-Speech: Enabled
- Don't have a Kindle? [Get your Kindle here.](#)

Buy now with 1-Click®



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

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi dell'Insubria, Via J.H. Dunant 3, I-21100 Varese, Italy (E-mail: simon.pierce@uninsubria.it)

(Accepted September 2010)

Summary

The arctic-alpine White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) has so-far resisted attempts at *in vitro* reproduction from seed, but a practical method is required for its conservation. We hypothesised that, having similar seeds to the notoriously intractable orchid *Cypripedium calceolus*, immature seeds can germinate *in vitro* on mature and immature seeds from the Italian Alps, and sowed these in sterile conditions on M nutrient medium modified with either phytohormones or complex organic media (COM). Treatments included coconut milk, banana powder, malt extract and yeast extract, all at a 5%. Phytohormones, all at 20 mg L⁻¹, included 6-benzylaminopurine (BA), gibberellic acid and thidiazuron (TDZ), added to autoclaved growth media via filter sterilization. After six months, absolutely no germination of mature seeds for any treatment. Only 3.9% of immature seeds germinated in control treatment and germination in all COM treatments was not significantly greater than this. Phytohormones significantly increased germination of immature seed and promoted protocorm development. Coconut milk was most effective (50.5% germination) – this method can therefore be used to propagate the



Plant Biosystems, Vol. 144, No. 1, March 2010, pp. 121–127



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

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

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi dell'Insubria, Italy

Abstract

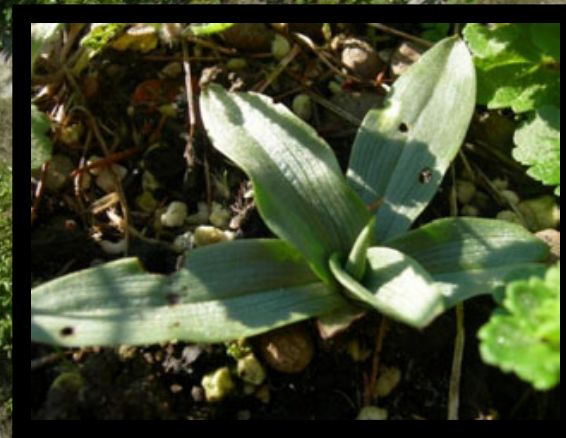
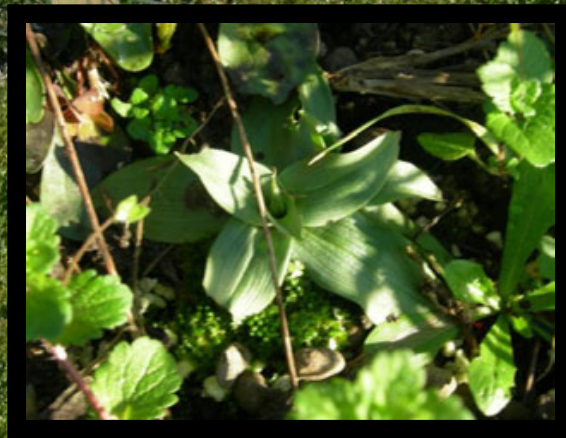
The Insubric bee orchid, *Ophrys benacensis* (Reisigl) O.&E. Danesch & F. Ehrend, occurs in fragmented populations only in northern Italy, and suffers from inbreeding depression. We found that pollen from a depressed population at Monte Barro, Lecco, did not fertilise plants of the same population, nor of a larger population at nearby Valmadrera. Fertilisation was successful at both sites when pollen from Valmadrera was used, although the proportion of seeds containing embryos was almost six times greater at Valmadrera. Embryos produced by both populations were equally likely to develop *in vitro*. Sowing seed on medium enriched with 50 mL L⁻¹ coconut milk more than doubled the germination rate with respect to a non-enriched control (i.e. from 14.5% to 39.8%; $p = 0.024$, Student's *t*-test), whereas other complex organic media inhibited germination. We conclude that both pollen and ovules have inherent developmental problems that can be partially overcome by outbreeding with larger populations. Once seed is produced propagation is relatively easy: sufficient plantlets were produced to enlarge the Monte Barro population to 195 times its current size.



White identification tag with illegible text.

White identification tag with illegible text.

Vertical green identification tag with illegible text.



Ophrys sphegodes



28/3/2011

Ophrys sphegodes

Orchid conservation using *in vitro* techniques

a practical course for the germination, cultivation
and transplantation of temperate-zone terrestrial orchids



Roberta Ceriani:

centroflora@parcobarro.it









simon.pierce@unimi.it

Roberta Ceriani: centroflora@parcobarro.it

