

# Propagazione *in vitro* di orchidee native di praterie aride: effetti delle condizioni colturali sulla germinazione, lo sviluppo delle plantule e la formazione di tuberi

Elisabetta Sgarbi<sup>\*</sup>, Laura Bernardi<sup>1</sup>, Andrea Pirondini<sup>1</sup>, Enrico Gatti<sup>1</sup>, Lucio Taverna<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

<sup>2</sup> Direzione centrale infrastrutture e territorio, Servizio paesaggio e biodiversità, Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Udine

## ***In vitro* propagation of wild orchids native of dry grasslands: effects of cultural conditions on germination, plantlets development and tuber formation**

**Abstract.** Within the European Project LIFE 10/NAT/IT/000243 - Friuli Venezia Giulia Region - four orchid species distinctive of the habitat of Community Importance 62A0 (Eastern sub-Mediterranean dry grasslands) have been propagated by seeds. The main aim of the Project is plants reintroduction, with reinforcement of wild populations and biodiversity conservation. Two different culture media were compared for germination and protocorms growth: Basal Medium 1 and Basal Medium 1 added with coconut water. Results showed that coconut water stimulates the germination of *Anacamptis coriophora*, *Anacamptis pyramidalis* and *Gymnadenia conopsea*; a positive effect of this natural compound brought out also for *Serapias vomeracea*, during following protocorms development. Furthermore, culture medium enriched with coconut water promoted plantlets growth, evaluated as length of young leaves within 6 – 9 months from seeding. Unlike the other species, *Serapias vomeracea* grew without distinction to growth medium. All orchid plants have been maintained in *in vitro* conditions until tubers production. These underground perennial organs gain an important role in nutrient storage and propagation, maintaining viable dormant buds during adverse environmental conditions. Consequently, their presence could provide a good response during plants transferring in greenhouse for the acclimatization.

**Key words:** Orchidaceae, seeds, culture media, coconut water, hypogeous organs

## Introduzione

Il rischio di estinzione che attualmente corrono molte specie di orchidee è una conseguenza di vari fattori avversi, tra cui l'impatto antropico sempre più pressante sugli ambienti naturali, la modificazione e la frammentazione degli habitat, la rarefazione/scomparsa degli insetti impollinatori, i cambiamenti climatici in corso. Nell'ambito del progetto europeo LIFE 10/NAT/IT/000243 "Restoration of dry grasslands (magredi) in four sites of community importance of Friuli lowland" della Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, sono state propagate *in vitro* da seme quattro specie di orchidee caratteristiche dell'habitat di interesse comunitario 62A0 (formazioni erbose secche della regione sub-mediterranea orientale), al fine di reintrodurle *in situ*, con rafforzamento delle popolazioni esistenti e conservazione della biodiversità (fig. 1).

## Materiali e metodi

Semi maturi di *Anacamptis coriophora* (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase, *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br., *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. sono stati prelevati da popolazioni di orchidee native di praterie aride in Friuli Venezia Giulia (Italia). I semi sono stati sottoposti a sterilizzazione/scarificazione per immersione in NaOCl (1,5% di Cl attivo) + Tween 20 all'1% per 2 minuti (semi di *A. coriophora*, *A. pyramidalis*, *G. conopsea*) e per 3 minuti (semi di *S. vomeracea*); al termine del trattamento i semi sono stati lavati per tre volte con acqua sterile e dispersi sulla superficie del substrato di coltura in capsule Petri. Per le prove di germinazione, lo sviluppo dei protocormi e delle plantule sono stati confrontati due substrati di coltura: BM1 (Basal Medium 1,

\* elisabetta.sgarbi@unimore.it



Fig. 1 - Un prato tipico dell'habitat 62A0: formazioni erbose secche della regione sub-mediterranea orientale (*Scorzoneralia villosae*).

Fig. 1 - A dry meadow typical of habitat 62A0: Eastern sub-Mediterranean dry grasslands (*Scorzoneralia villosae*).

PhytoTechnology Laboratories) e BM1 con aggiunta di acqua di cocco al 5% (PhytoTechnology Laboratories), quest'ultimo indicato come BM1 + CW. In entrambi i substrati erano aggiunti carbone attivo 1g/l e agar 5 g/l (Plant Agar, Duchefa Biochemie); il pH era aggiustato a  $6.3 \pm 0.1$  prima della sterilizzazione in autoclave. In BM1 + CW l'acqua di cocco sterile era aggiunta dopo la sterilizzazione. Le piante erano trasferite periodicamente sullo stesso tipo di substrato utilizzato per la germinazione e mantenute *in vitro* fino alla produzione dei tuberi. Per consentire lo sviluppo delle foglie, delle radici e dei tuberi le piante erano trasferite in vasi Microbox o tubi De Wit. Come parametro di crescita delle piante *in vitro* è stato considerato l'allungamento delle foglioline.

I dati di germinazione, crescita dei protocormi e delle plantule ottenuti sui due substrati erano confrontati tra loro applicando il T-Test.

## Risultati e discussione

L'analisi dei dati ottenuti ha confermato che il substrato BM1, che fornisce azoto solo in forma organica, come miscela di aminoacidi, risponde molto bene alle esigenze nutritive delle orchidee terrestri durante le fasi di sviluppo, dalla germinazione alla crescita dei protocormi, nelle quali esse sono eterotrofe (Rasmussen, 1995; Sgarbi *et al.*, 2009; Van Waes e Debergh, 1996). L'aggiunta dell'acqua di cocco stimola in modo significativo la germinazione di *A. coriophora*, *A. pyramidalis* e *G. conopsea* (fig. 2); l'effetto positivo esercitato da questo complesso

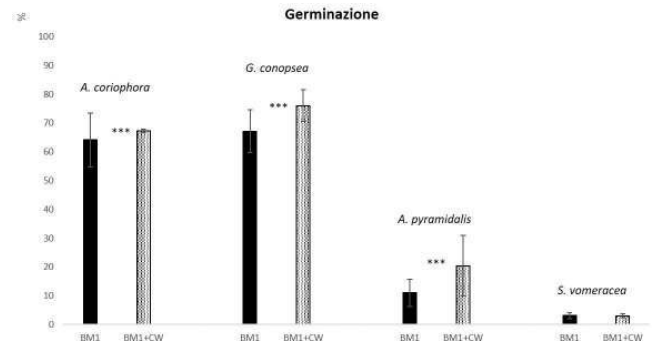


Fig. 2 - Percentuali di germinazione ottenute *in vitro* sui due substrati di coltura: BM1 e BM1 + CW. Per tutte le specie, ad esclusione di *S. vomeracea*, la germinazione aumenta significativamente su BM1 con acqua di cocco \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Fig. 2 - Germination percentages obtained *in vitro* on the two culture media: BM1 and BM1 + CW. For all species, except *S. vomeracea*, germination significantly improves on BM1 with coconut water \*\*\* $p \leq 0.001$ .

nutriente è emerso anche per *S. vomeracea*, ma solo in seguito, durante la crescita dei protocormi (fig. 3). Lo sviluppo *in vitro* delle plantule ha confermato l'efficacia dell'acqua di cocco nel promuovere la crescita in tutte le specie, ad esclusione di *S. vomeracea* (fig. 4). Per questa specie, i risultati relativi alla germinazione e alla crescita *in vitro* ottenuti sono in contrasto con quelli di precedenti ricerche nelle quali *S. vomeracea* si era mostrata molto vigorosa e poco esigente riguardo al substrato (Sgarbi *et al.*, 2007). La ridotta percen-

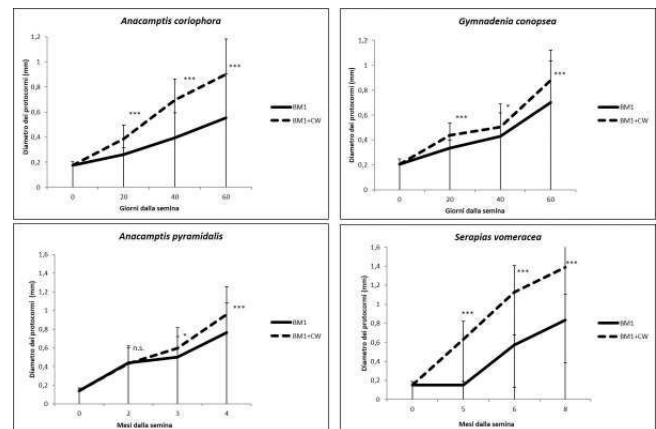


Fig. 3 - Effetto del mezzo di coltura sulla crescita dei protocormi. Si osserva una maggior crescita dei protocormi di *A. coriophora* e *G. conopsea* già durante i primi 20 giorni sul substrato arricchito con acqua di cocco (BM1 + CW). In *A. pyramidalis* l'effetto positivo dell'acqua di cocco si rende evidente solo dal secondo mese di coltura. BM1 + CW stimola la crescita dei protocormi *S. vomeracea* sin dai primi mesi di coltura. n.s. non significativo; \*  $p \leq 0,5$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$

Fig. 3 - The effect of culture medium on protocorms growth. A higher growth of *A. coriophora* and *G. conopsea* protocorms is already observed on BM1 + CW during the first 20 days from sowing. In *A. pyramidalis* this positive effect is clear only for the second month of culture. BM1 + CW stimulates protocorms growth in *S. vomeracea* for first months of culture. n.s. not significant; \*  $p \leq 0.5$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

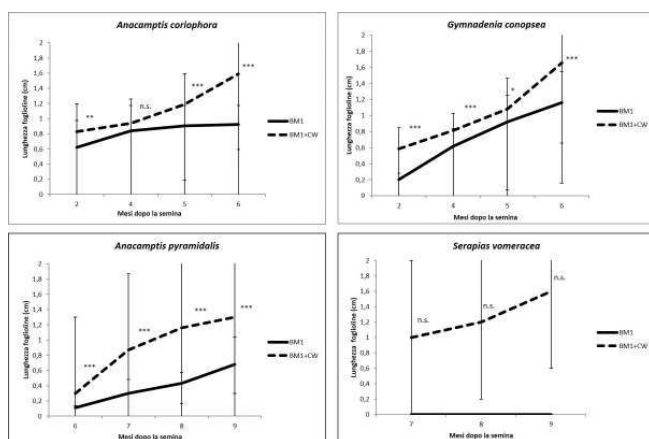


Fig. 4 - Crescita delle piante *in vitro*, valutata misurando la lunghezza delle foglioline. L'effetto promotore dell'acqua di cocco emerge anche durante le fasi di sviluppo delle piante. *S. vomeracea*, al contrario, in questa fase di sviluppo sembra indifferente al substrato di coltura. n.s. non significativo; \*  $p \leq 0,5$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

Fig. 4 - *In vitro plants growth, evaluated by measuring leaflets length. The promoting effect of coconut water emerges during plants development, too. On the contrary, S. vomeracea appears indifferent to culture medium in this developmental phase. n.s. not significant; \*  $p \leq 0.5$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .*

tuale di germinazione e il tempo richiesto per la germinazione in questa specie sono probabilmente da collegarsi alla qualità dei semi, piuttosto che a modalità di scarificazione poco efficaci. Per tutte le specie considerate è stata osservata la formazione di tuberi. Questi organi sotterranei svolgono un ruolo importante nello stoccaggio di nutrienti e nella sopravvivenza delle gemme perennanti durante le stagioni sfavorevoli. Piante con tubero possono essere avvantaggiate durante l'acclimatazione, nel superare lo stress da trapianto.

## Riassunto

Nell'ambito del progetto europeo LIFE 10/NAT/IT/000243 "Restoration of dry grasslands (magredi) in four sites of community importance of Friuli lowland" sono state propagate *in vitro* da seme quattro specie di orchidee caratteristiche dell'habitat 62A0. Sono stati confrontati due substrati di coltura che differivano per la presenza/assenza di acqua di cocco; l'azione stimolante di questo complesso nutriente è emersa per tutte le specie, ad eccezione di *Serapias vomeracea*, in ogni fase di sviluppo. Le orchidee sono cresciute *in vitro* producendo, al termine del loro ciclo di sviluppo, un tubero come organo ipogeo di riserva.

**Parole chiave:** Orchidaceae, semi, substrati, acqua di cocco, organi ipogei

## Bibliografia

- SGARBI E, GRIMAUDDO M., DEL PRETE C., 2007. *In vitro asymbiotic growth of Mediterranean terrestrial orchids from immature seeds*. J. Eur. Orch., 39 (3/4): 611 – 624.
- SGARBI E, GRIMAUDDO M., DEL PRETE C., 2009. *In vitro asymbiotic germination and seedling development of Limodorum abortivum (Orchidaceae)*. Plant Biosystems, 143 (1): 114-119.
- RASMUSSEN HN., 1995. *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant*, Cambridge University Press (Cambridge).
- VAN WAES JM., DEBERGH PC., 1986. *In vitro germination of some Western European orchids*. Physiol Plant 67 (2): 253–261.

Ricerca svolta nell'ambito del Progetto Life + Nature and Biodiversity 10/NAT/IT/243 Restoration of dry grasslands (magredi) in four sites of community importance of Friuli lowland. Beneficiario del co-finanziamento: Servizio caccia, risorse ittiche e biodiversità – Direzione centrale e risorse rurali, agroalimentari e forestali - Regione autonoma Friuli Venezia Giulia.